

**Identifizierung und Charakterisierung
regio-spezifisch exprimierter Gene
bei *Hydra vulgaris***

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

**Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Tobias Hotz
aus Heidelberg

Marburg/Lahn 2006

Meinem Vater

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 13.07.2006
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Monika Hassel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung am 21.09.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Modellorganismus <i>Hydra vulgaris</i>	1
1.1.1	Die Morphologie von <i>Hydra</i>	1
1.1.2	Die potentielle Unsterblichkeit durch stetige Zellerneuerung	3
1.1.3	Das Regenerationsvermögen von <i>Hydra</i>	3
1.1.4	Die vegetative Fortpflanzung erfolgt bei <i>Hydra</i> durch Knospung	4
1.1.4.1	Die Phasen und Stadien der Knospung	4
1.1.4.2	Die Bewegung von Gewebe während der Knospung	5
1.1.4.3	Die Induktion der Knospung	6
1.1.4.4	Die molekularen Grundlagen der Knospeninduktion	7
1.2	Das aborale Ende von <i>Hydra</i> – der Fuß	7
1.2.1	Die Morphologie des aboralen Endes	8
1.2.2	Die Fußbildung während der Regeneration	8
1.2.3	Die Fußbildung bei der Knospung	9
1.2.4	Die chemisch induzierte Fußbildung	9
1.2.4.1	Die ektopische Fußbildung durch Lithium-Chlorid	10
1.2.4.2	Die Fußbildung durch Polaritätsumkehr	10
1.2.5	Die molekulare Steuerung der Fußbildung	11
1.2.5.1	Gene zur Differenzierung von fußspezifischen Gewebes	11
1.2.5.2	Die molekulare Grundlage der Fußbildung während der Knospung	13
1.3	Funktionelle Untersuchungen bei <i>Hydra</i>	13
1.3.1	Die genetische Funktionsanalysen	13
1.3.2	Transgene Hydren	14
1.3.3	Die Blockierung der Genexpression durch antisense-Oligonukleotide	14
1.3.4	Die RNA Interferenz Methode	15
1.4	Ziel der Arbeit	17
2	Ergebnisse	1
2.1	Die Identifikation von cDNAs aus zwei Expressionsscreenings	18
2.1.1	Der Klon <i>K10-7</i>	23
2.1.1.1	Die cDNA-Sequenz von <i>K10-7</i> ist vollständig	23
2.1.1.2	Die Northern Blot Analyse von <i>K10-7</i> zeigt ein Transkript von 1.1 kb	25
2.1.1.3	<i>K10-7</i> ähnelt der EGF-ähnlichen Domäne der Tenascine und Teneurine 26	
2.1.1.3.1	Vergleich der EGF-ähnlichen Domäne der Tenascine und Teneurine mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor aus Maus	27
2.1.1.3.2	Die <i>K10-7</i> Sequenz entspricht linear hintereinander liegenden Motive bekannter Teneurine und Tenascine	32

2.1.1.4	Abgeleitete Faltstruktur der EGF-ähnlichen Domäne von K10-7	36
2.1.1.5	Die Expression von <i>K10-7</i>	42
2.1.1.5.1	Die Expression von <i>K10-7</i> in morphogenetisch aktiven Tieren.....	42
2.1.1.5.2	Die flecken- und ringförmige Expression von <i>K10-7</i> bei ektopischer Fußbildung	44
2.1.1.5.3	<i>K10-7</i> und <i>kringelchen</i> werden an der Knospenbasis koexprimiert	46
2.1.2	Die cDNAs <i>MK55</i> und <i>MK97</i>	48
2.1.2.1	Den cDNA-Sequenzen <i>MK55</i> und <i>MK97</i> fehlt das N-terminale Ende	48
2.1.2.2	Im Northern Blot hybridisiert <i>MK55</i> mit einer und <i>MK97</i> mit zwei Banden	51
2.1.2.3	<i>MK55</i> und <i>MK97</i> haben Sequenzähnlichkeit mit Rhamnose-bindenden Lektinen.....	52
2.1.2.4	<i>MK55</i> und <i>MK97</i> haben Ähnlichkeit mit einer großen Gruppe von Sequenzen aus einer EST-Datenbank	57
2.1.2.4.1	EST-Sequenzen von <i>H. magnipapillata</i> mit einer Ähnlichkeit zu <i>MK55</i> .	57
2.1.2.4.2	EST-Sequenzen von <i>H. magnipapillata</i> mit einer Ähnlichkeit zu <i>MK97</i> .	57
2.1.2.4.3	Die Konstruktion eines möglichen RBL aus <i>H. echinata</i>	58
2.1.2.4.4	EST-Sequenzen von <i>H. magnipapillata</i> , <i>H. echinata</i> und <i>H. oligactis</i> mit Ähnlichkeit zu Rhamnose-bindenden Lektine.....	62
2.1.2.5	Die Expression von <i>MK55</i> und <i>MK97</i>	64
2.1.2.5.1	Die Expression von <i>MK55</i> und <i>MK97</i> in morphogenetisch aktiven Tieren.....	64
2.1.2.5.2	Die Expression von <i>MK55</i> und <i>MK97</i> während der Knospung	66
2.1.3	Die cDNA <i>MK38</i>	68
2.1.3.1	Die cDNA-Sequenz von <i>MK38</i> ist unvollständig.....	68
2.1.3.2	Die Northern Blot Analyse identifiziert für <i>MK38</i> ein Transkript der Größe 6,9 kb.....	70
2.1.3.3	Das Transkript <i>MK38</i> ähnelt der TOG Domäne Mikrotubuli-assoziiierter Proteine.....	70
2.1.3.4	<i>MK38</i> wird von entodermalen Zellen mit Ausnahme von Zellen des Hypostoms exprimiert.....	76
2.2	Anpassung der Elektroporationsbedingungen zur Durchführung der RNAi Methode bei <i>Hydra vulgaris</i>	77
2.2.1	Die Optimierung der Elektroporationseffizienz bei <i>Hydra vulgaris</i>	77
2.2.1.1	Die getesteten Elektroporationsgeräte	77
2.2.1.2	Der Aufbau der Elektroporationsversuche.....	80
2.2.1.3	Die Variationen der Elektroporationsbedingungen	81
2.2.1.4	Die Elektroporationseffekte von <i>K10-7</i> dsRNA auf <i>Hydra vulgaris</i>	83

2.2.1.5	Zusammenfassung der Elektroporationseffekte	84
3	Diskussion.....	86
3.1	Das Sequenzieren der Transkripte ohne fußspezifischem Expressionsmuster führte zur Identifikation von Haushalts-Genen	86
3.2	<i>MK38</i> kodiert ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein	87
3.3	<i>MK55</i> und <i>MK97</i> zeigen Sequenzähnlichkeit mit Proteinen der Familie Rhamnose-bindender Lektine	89
3.4	<i>K10-7</i> ist möglicherweise an der Zelldifferenzierung beteiligt.....	91
3.5	Die Etablierung der RNAi-Methode bei <i>Hydra vulgaris</i> (Zürich)	94
3.6	Ausblicke.....	96
4	Material und Methoden	98
4.1	Material	98
4.1.1	Versuchstiere	98
4.1.2	Chemikalien	98
4.1.3	Enzyme	98
4.1.4	Kit-Systeme	99
4.1.5	Alkalische Phosphatase Konjugate	99
4.1.6	Sonstige Materialien	99
4.1.7	Geräte	100
4.1.8	Primer	101
4.2	Methoden	102
4.2.1	Die Haltung von <i>Hydra vulgaris</i>	102
4.2.2	In vivo Versuche mit <i>Hydra vulgaris</i>	102
4.2.2.1	Regenerationsversuche.....	102
4.2.2.2	Die Induktion ektopischer Füße mittels LiCl	103
4.2.2.3	Der Nachweis ektopisch gebildeter Füße bei <i>Hydra vulgaris</i> mittels Peroxidasefärbung	103
4.2.2.4	Die Fixierung von <i>Hydra vulgaris</i>	103
4.2.2.5	Die Ganztier Elektroporation von <i>Hydra vulgaris</i>	104
4.2.3	Die Ganztier <i>in situ</i> Hybridisierung	105
4.2.3.1	Die verwendeten RNA-Sonden	105
4.2.3.2	Die Einzelmarkierung	105
4.2.3.3	Die Doppelmarkierung.....	105
4.2.4	Molekulare Methoden	106
4.2.4.1	Molekulare Standardmethoden	106
4.2.4.2	Die Polymerase Kettenreaktion, PCR	106
4.2.4.3	Sequenzierung	107

4.2.4.3.1	Die manuelle Sequenzierung	107
4.2.4.3.2	Die Sequenzierung mit ABI Prism 310 Analyser	107
4.2.4.3.3	Die Sequenzierungen durch die Firma Seqlab	107
4.2.4.3.4	Die Sequenzanalyse	107
4.2.4.4	Die Isolierung von RNA aus <i>Hydra vulgaris</i>	107
4.2.4.4.1	Die Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Hydra vulgaris</i>	107
4.2.4.4.2	Die Isolierung von poly(A) ⁺ -RNA aus <i>Hydra vulgaris</i>	108
4.2.4.5	Die Northern Blot Analyse	108
4.2.4.6	Die Synthese der Doppelstrang-RNA (dsRNA)	108
5	Literatur	110
6	Abkürzungen	126
7	Anhang	128
7.1	cDNA Sequenzen des Expressionsscreenings	128
7.2	Alignments der RBL EST-Sequenzen	133
7.2.1	Alignment mit <i>MK55</i> und EST-Sequenzen	134
7.2.2	Alignment mit <i>MK97</i> und EST-Sequenzen	136
7.2.3	Alignment der EST-Sequenzen aus <i>H. echinata</i>	147
7.3	Sequenzähnlichkeit der HEAT Sequenzwiederholungen von <i>MK38</i> und den Proteinen der MAP215/Dis1 Familie	148
8	Zusammenfassung	149
9	Danksagung	150
10	Lebenslauf	151
11	Erklärung	152

1 Einleitung

Der Süßwasserpolytyp *Hydra vulgaris* gehört zum Stamm der Cnidaria. Die Cnidaria sind wie die Ctenophora und Porifera phylogenetisch vor der Entwicklung der Bilateria entstanden (Wainright et al. 1993; Collins 1998; Adoutte et al., 2000; Kortschak et al., 2003; Miller et al., 2005). Diese frühe Abspaltung im Laufe der Evolution macht den Vergleich zwischen *Hydra* und höher entwickelten Modellorganismen in Hinsicht auf die Entstehung und Konservierung von ursprünglichen Entwicklungsprozessen interessant.

1.1 Der Modellorganismus *Hydra vulgaris*

Es war Abraham Trembley, der um 1735 die ersten Regenerationsversuche mit dem Süßwasserpolytypen *Hydra* durchführte. Diese Versuche, die er in den „Mémoires“ (Trembley, 1735) veröffentlichte, markieren den Beginn der experimentellen Entwicklungsbiologie und machten *Hydra* zum ersten Modellorganismus der modernen Wissenschaft. Bis heute hat *Hydra vulgaris* nichts von ihrer Attraktivität als Modellorganismus eingebüßt. Der einfache Körperbau und die geringe Anzahl unterschiedlicher Zelltypen ermöglichen die Untersuchungen komplexer entwicklungsbiologischer Mechanismen an einem einfachen Organismus. Das hohe Regenerationsvermögen und die asexuelle Fortpflanzung durch Knospung lassen Untersuchungen bezüglich der Aufrechterhaltung bestehender bzw. der Entstehung neuer Körperachsen zu. Aufgrund dieser Ursprünglichkeit von *Hydra vulgaris*, besteht die Möglichkeit, Signaltransduktionswege im diploblastischen Organismus zu untersuchen und die Ergebnisse mit den Erkenntnissen aus der triploblastischen Modellorganismenforschung zu vergleichen (Galliot, 2000).

1.1.1 Die Morphologie von *Hydra*

Die nur wenige Millimeter große *Hydra* besitzt einen radiärsymmetrischen Körperbau mit nur einer Polaritätsachse, der oral – aboralen Achse (Abb. 1). Der Körperaufbau ist in Kopfregion, Rumpf und Fußregion gegliedert. Am distalen Ende befindet sich der Kopf, bestehend aus dem Hypostom mit Mundöffnung und dem umgebenden Tentakelkranz. Darauf folgt die Rumpfregion, die aus Gastralregion und die daran angrenzende Knospungsregion besteht. Das aborale Ende bilden die Stielregion, deren Größe je nach Art variiert, und die Basal- oder Fußscheibe. Mittels der Fußscheibe ist der Polyp am Untergrund

festgeheftet. In der Mitte der Fußscheibe befindet sich eine Vertiefung, die Trembley als Aboralpore bezeichnete. Er spekulierte, dass es sich dabei um eine zweite Körperöffnung handele (Trembley, 1743). Burnett (1966) ging davon aus, dass sie beim Anheften und Ablösen an das Substrat eine Rolle spielt.

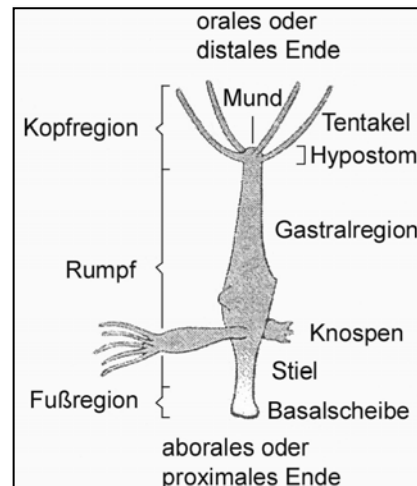


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Hydra mit Knospe (nach Müller und Hassel, 2002).

Histologisch besteht der diploblastische Hydrapolyp aus Ekto- und Entoderm (Gastrodermis), die durch eine kollagenhaltige, azelluläre Mesogloea getrennt werden. In ihren Bestandteilen entspricht die Mesogloea der extrazellulären Matrix der Bilaterier (Sarras et al., 1991; Yan et al., 1995). Die ektodermalen Epithelmuskelzellen besitzen in ihren basalen Zellfortsätzen parallel zur Körperachse angeordnete Myofibrillen. Mittels dieses Zelltyps gelingt die Kontraktion des Polyps. Die Myofibrillen der entodermalen Epithelmuskelzellen sind dagegen ringförmig angeordnet und ermöglichen so die Elongation.

Die Gastrodermis enthält Drüsenzellen deren Sekret zur Verdauung der Nahrung dient.

In den terminalen Strukturen finden sich hoch spezialisierte Zellen. In den Tentakeln sind dies drei verschiedene Nesselzelltypen, die Stenotelen (Penetranten), die Desmonemen (Volventen) und die Isorhizen (Gluthinanten) die dem Beutefang dienen (David, 1973). Die Fußscheibe enthält Drüsenzellen, die ein Sekret absondern, das der Anhaftung an den Untergrund dient (Burnett, 1966).

Das Nervennetz von *Hydra vulgaris* repräsentiert einen ursprünglichen Typ eines Nervensystems. Es erstreckt sich über den ganzen Körper (Hadzi, 1909), mit einer Konzentrierung von Zellen in der Kopf- und Fußregion (Bode et al., 1973). Gebildet wird das Nervensystem aus drei morphologisch unterschiedlichen Zelltypen, den ganglionären, den sensorischen und den sekretorischen Nervenzellen (Davis et al., 1968). Als Neurotransmitter wurden bisher bei *Hydra* fast ausschließlich Peptide identifiziert (Grimmelikhuijzen et al. 1996). Dies führt zur Annahme, dass Neuropeptide die ersten Signalmoleküle waren, die von den frühen Nervensystemen benutzt wurden.

1.1.2 Die potentielle Unsterblichkeit durch stetige Zellerneuerung

Aufgrund permanenter Proliferation epithelialer Stammzellen in der Gastralregion ist *Hydra vulgaris* potentiell unsterblich. Die neu gebildeten Zellen gelangen durch den steten Gewebefluss in die Kopf- und Fußregion. Am Zielort differenzieren sie und ersetzen abgestorbene Zellen, die am apikalen und basalen Ende abgestoßen werden (Campbell, 1967b; Teragawa und Bode, 1995). Unter optimalen Umweltbedingungen führt eine überzählige Produktion von Zellen zur Knospenbildung (Brien und Reniers-Decoen, 1949). Aus den epithelialen Stammzellen gehen Muskelzellen und ektodermale Drüsenzellen hervor.

Neben den epithelialen Stammzellen gibt es die interstitiellen Stammzellen (I-Zellen), die in Zellnestern in den Zellzwischenräumen der Gastralregion und im Stiel vorkommen. Diese differenzieren zu Nematocyten, Nerven-, Drüsen- und Geschlechtszellen (Müller et al., 1988).

1.1.3 Das Regenerationsvermögen von *Hydra*

Hydra vulgaris hat ein hohes Regenerationsvermögen. Fehlende Körperteile werden innerhalb von 48 Stunden in korrekter Position an der Körperachse neu gebildet (Webster und Wolpert, 1966; Wolpert, 1971). Selbst kleinste Gewebefragmente ohne Kopf und Fuß, die nur noch 1/20 des ursprünglichen Volumens umfassen, regenerieren vollständig (Tripp, 1928; Müller et al., 1989).

Wird bei *Hydra* die Zellteilung entweder durch Bestrahlung (Hicklin und Wolpert 1973; Noda und Egami, 1975) oder mit Hydroxyharnstoff, eine Chemikalie die die S-Phase in der Mitose blockiert (Cumming und Bode, 1984), unterbunden, so bleibt die Regenerationsfähigkeit des Polypen erhalten. Diese Versuche zeigen, dass die Neubildung der fehlenden Strukturen durch Morphallaxis, d. h. durch Umorganisation und Dedifferenzierung von vorhandenem Gewebe, erfolgt (Wolpert, 2002).

Die Fähigkeit Strukturen zu regenerieren wird mit dem Positionswert (P-Wert) der Zellen begründet, der eine endogene Positionsinformation ist. Der P-Wert vermittelt den Zellen ihre relative Lage zueinander und zeichnet sich für ein zelluläres Positionsgedächtnis aus (Wilby und Webster, 1970; Gierer und Meinhardt, 1972). Der P-Wert ist in der Kopfregion am höchsten und nimmt zum Fußende hin ab. Gewebe mit höherem P-Wert besitzt ein höheres Kopfbildungspotenzial. Durch diese graduelle Verteilung entsteht eine Polarität innerhalb des Polypen. Zur Bestimmung des P-Werts dienen einfache Transplantationsexperimente. Werden Gewebefragmente einer apikal gelegenen Region, also mit einem hohen P-Wert, in eine distal gelegene Region mit einem geringen P-Wert transplantiert, so entsteht an dem

Transplantat ein sekundärer Kopf. Umgekehrt bildet sich an einem distalen Transplantat in einer apikalen Region ein sekundärer Fuß (Müller, 1996).

1.1.4 Die vegetative Fortpflanzung erfolgt bei *Hydra* durch Knospung

Die vegetative Fortpflanzung bei *Hydra vulgaris* erfolgt durch Knospung. Dabei entsteht in der Knospungsregion durch Ausbildung einer zweiten Körperachse, ein neuer Polyp. Dies ermöglicht Untersuchungen der dabei ablaufenden molekularen Mechanismen.

1.1.4.1 Die Phasen und Stadien der Knospung

Die Knospung kann in drei Phasen, die Initiation, die Elongation und die Ablösung unterteilt werden. Die einzelnen Stadien der Knospe während dieser drei Phasen haben Otto und Campbell (1977) beschrieben (Abb. 2). Die Initiation der Knospung wird durch eine fleckenförmige Verdichtung in der Knospungsregion sichtbar. Von dieser Stelle aus bildet sich eine dreieckige Ausstülpung (Stadium 1 und 2). Nach etwa 3 - 6 Stunden beginnt die Elongationsphase. Dabei nimmt die Ausstülpung an Volumen zu, flacht am apikalen Ende ab und wächst zylinderförmig aus (Stadium 3 – 5). Die ersten Tentakelknospen sind nach 24 Stunden zu erkennen (Stadium 6). Im weiteren Verlauf wachsen die Tentakelknospen aus und neue Tentakel entstehen (Stadium 7). Die Phase der Ablösung beginnt etwa 48 Stunden nach Initiation (Stadium 8). Dabei zieht sich das Gewebe am proximalen Ende der Knospe, dicht am Muttertier zusammen. Die Differenzierung der Fußscheibe erfolgt direkt an der Einschnürung auf der Knospenseite (Stadium 9). Das Fußgewebe ist zwar stark vom Gewebe des Muttertiers abgegrenzt, aber immer noch mit diesem verbunden. Nach etwa 70 Stunden ist die Fußscheibe vollständig ausgebildet (Stadium 10). Es ist nun keine Gewebeverbindung zwischen Knospe und Muttertier mehr zu erkennen, und der Jungpolyp löst sich ab.

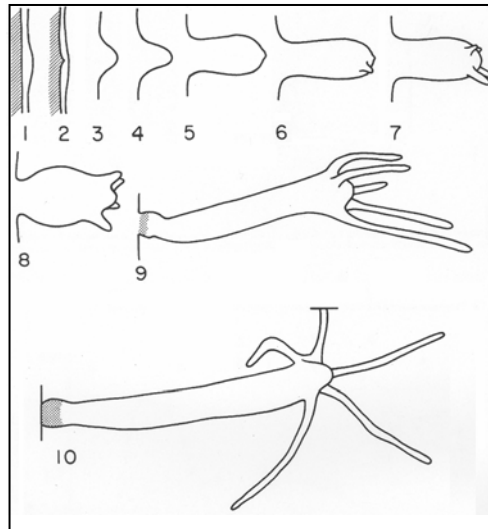


Abb. 2: Die zehn Knospenstadien nach Otto und Campbell (1977). Erklärung der einzelnen Knospenstadien im Text (verändert nach Otto und Campbell, 1977).

1.1.4.2 Die Bewegung von Gewebe während der Knospung

Die Initiation der Knospung beruht auf einer kreisförmigen Rekrutierung parentaler Epidermiszellen aus der Knospungsregion (Abb. 3) (Otto und Campbell, 1977; Graf und Gierer, 1980).

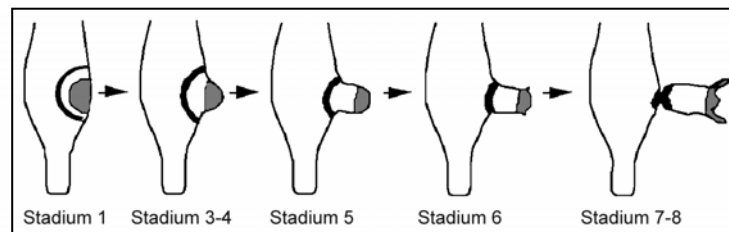


Abb. 3: Rekrutierung von maternalem Gewebes zur Bildung der Knospe (nach Fabila et al., 2002)

Zu diesem Zeitpunkt wird das Schicksal der Zellen im Jungpolypen festgelegt. Im Zentrum befindliche Zellen bilden den zukünftigen Kopf. Zellen des mittleren konzentrischen Ringes werden zu Zellen der Gastralregion (Abb. 3). Aus der äußeren Region werden Zellen rekrutiert, die den Fuß bilden. Die rekrutierten parentale Zellen verändern während der Phasen der Knospung ihre Form: sie unterlaufen eine Zellvolumenänderung durch eine Devakuolisierung, die zu einer säulenförmigen Zellform führt. Diese Zellformänderung verringert die Kontaktfläche mit der Mesogloea. Vor der Evagination der Knospe erfolgt die Rekrutierung von etwa 800 entodermalen und ektodermalen Zellen. Das Wachstum der Knospe bis Knospenstadium 3 erfolgt ausschließlich durch Rekrutierung von Zellen. Wenn die Knospe aus zirka 5000 Zellen besteht, werden die ersten Tentakel gebildet (Graf und

Gierer, 1980). Zu diesem Zeitpunkt stoppt die Einwanderung von Zellen in die Knospe. Ab jetzt wächst die Knospe durch zusätzliche Zellteilung (Holstein et al., 1991).

Beim Auswachsen der Knospe ändert sich die Orientierung der Fortsätze der eingewanderten entodermalen und ektodermalen Epithelmuskelzellen (Otto, 1977; Graf und Gierer, 1980). Im Muttertier verlaufen die kontraktile Fasern der entodermalen Epithelmuskelzelle senkrecht, die der ektodermalen parallel zur Körperachse (siehe 1.1.1). Bei der Evagination erfolgt noch keine Umorientierung dieser Fortsätze. Die Ausrichtung, die der Orientierung der neuen Körperachse entspricht, setzt in der frühen Elongationsphase (Stadium 4) am apikalen Ende ein. Proximal verbleiben die kontraktile Fasern im Chaos. Dieses entwirrt sich in der späten Elongationsphase, wobei nur ein kleiner Streifen direkt zwischen Muttertier und Knospe ungeordnet verbleibt. Ab Stadium 9 differenzieren die proximal gelegen Zellen zu Fußscheibenzellen.

1.1.4.3 Die Induktion der Knospung

Die Fähigkeit zur Knospung liegt vermutlich in den epithelialen Zellen selbst. Hydren, die nur aus Epithelzellen bestehen, sind immer noch zur Knospung befähigt (Diehl und Burnett, 1965; Campbell 1976). Ausschlaggebend für die Knospeninduktion scheint die Zellanzahl des Muttertiers zu sein. Dabei spielt Zellproliferation eine untergeordnete Rolle. Dies zeigten Webster und Hamilton (1972) durch Zelltransplantationsexperimente. Als Versuchstiere dienten ihnen fünf Tage ungefütterte Hydren. Bei wohlgenährten Tieren erfolgt die Zellproliferation mehr oder weniger entlang der gesamten Körperachse mit Ausnahme der Tentakel und des Fußes (Campbell, 1967a; Clarkson und Wolpert, 1967). Bei fünf Tage ungefütterten Tieren, beträgt der mitotische Index gerade noch 10% im Vergleich zu gefütterten Polypen. Nach Fütterung der hungernden Tiere steigt der mitotische Index an, und nach 24 Stunden ist eine Vergrößerung der Zellpopulation um 30% erfolgt. Neue Knospen entstehen 24 – 72 Stunden später. In einem Transplantationsexperiment tauschten Webster und Hamilton (1972) das obere Drittel eines fünf Tage ungefütterten Polypen gegen die obere Hälfte eines ebenfalls ungefütterten Polypen aus. Diese relative Vergrößerung führte zur Knospung in der „neuen“ *Hydra*. Die Studien von Hamilton und Webster bewiesen also, dass allein die Zellanzahl des Polypen und nicht die Proliferationsrate für die Knospung verantwortlich ist. Die Zellproliferation spielt auch in den ersten Knospenstadien keine Rolle. Wird die Proliferation im Knospenstadium 1 oder 2 inhibiert, wird die Elongation der Knospe nicht verhindert (Clarkson und Wolpert, 1967; Webster und Hamilton, 1972).

1.1.4.4 Die molekularen Grundlagen der Knospeninduktion

Wie die Kopfregeneration wird auch die Knospung durch die Bildung einer sekundären Körperachse durch den Kopf-Organisator induziert (Broun et al., 2005). Der Kopf-Organisator ist in der Spitze des Hypostoms lokalisiert (Browne, 1909; Technau et al.; 2000, Broun und Bode, 2002) und wird durch den kanonischen WNT-Signaltransduktionsweg formiert bzw. aufrechterhalten (Broun et al., 2005). Als Komponenten des WNT-Signaltransduktionsweg sind *frizzled*, *dishevelled*, *Glycogen-Synthase-Kinase 3 β* (GSK-3 β), *β -catenin* und *Tcf/Lef* aus *Hydra* kloniert (Minobe et al., 2000; Hobmayer et al., 2000). FRIZZLED ist der Rezeptor für das Morphogen WNT und aktiviert DISHEVELLED, das seinerseits GSK-3 β deaktiviert. Die Kinase GSK-3 β phosphoryliert β -CATENIN, was dessen Abbau beschleunigt. Durch die Inaktivierung von GSK-3 β , wird β -CATENIN nicht mehr daran gehindert, in den Zellkern zu gelangen. Hier induziert es zusammen mit TCF/LEF die Transkription WNT-abhängiger Gene (Müller und Hassel, 2002).

Durch die Blockierung von GSK-3 β mit der Chemikalie Alsterpaullon konnte die Beteiligung des WNT-Signaltransduktionsweges im Kopf-Organisator nachgewiesen werden (Broun et al., 2005). Wird ein Stück Körpergewebe eines mit Alsterpaullon behandelten Polyps in die Körpersäule eines unbehandelten Polypen transplantiert, so wird eine neue Körperachse induziert. Diese Induktion erfolgt normalerweise nur bei der Transplantation des Hypostoms, also des Kopf-Organisators (Broun und Bode, 2002), nicht aber bei der Transplantation eines unbehandelten Gewebestücks gleicher Größe aus der Körpersäule (Yao, 1945; Broun und Bode, 2002). Die Inaktivierung von GSK-3 β führt auch zur Expression von Kopf-Genen in der Körpersäule. So wird HyBra1, das Hydra-Homolog zu Brachyury, und HyWnt nur im Kopf exprimiert (Technau und Bode, 1999; Hobmayer et al., 2000). In Alsterpaullon behandelten Tieren ist die Expression dieser Gene auch in der Körpersäule nachweisbar (Broun et al., 2005).

Auch GSK-3 β wird mit dem Kopf-Organisator in Verbindung gebracht (Broun et al., 2005). So kommt es durch die Aktivierung von Protein Kinase zur Inaktivierung von GSK-3 β und der Bildung ektopischer Tentakel und kompletter Köpfe entlang der Körperachse (Müller, 1989).

1.2 Das aborale Ende von *Hydra* – der Fuß

Das aborale Ende von *Hydra vulgaris* bilden der kurze Stiel und die Fußregion. Durch das Absondern von Sekret aus fußspezifischen Drüsenzellen ist es dem Polypen möglich, sich an den Untergrund zu heften (Hoffmeister und Schaller, 1985). Der direkte Kontakt der Fußregion mit dem Substrat birgt für den Polypen die Gefahr der Infektion mit Erregern. Um

diesem vorzubeugen, zeigt *Hydra* erste Ansätze einer Immunabwehr (Kasahara und Bosch, 2003).

Die Forschung der letzten Jahrzehnte hat viele Erkenntnisse über die Kopfbildung erbracht (Steele, 2002). Im Vergleich dazu weiß man über die Fußbildung verhältnismäßig wenig.

Zur Untersuchung der Fußbildung können drei experimentelle Ansätze eingesetzt werden: die Regeneration, die Bildung des Fußes während der Knospung und die ektopische Fußbildung. Bei Regenerationsversuchen wird die Fußneubildung, nach Verlust eines vorhandenen Fußes untersucht. Die natürliche Fußbildung kann bei der Knospung erforscht werden. Besonders interessant ist die ektopische Fußbildung. Hierbei wird in Geweben, die im Normalzustand nicht dazu in der Lage wären, Fußbildung induziert.

1.2.1 Die Morphologie des aboralen Endes

Wichtig für die Interpretation von Fußbildungsexperimenten ist die genaue Kenntnis der zellulären Struktur der Fußregion. Epidermale Zellen werden im Zuge des normalen Gewebeflusses aus dem Gastralraum in Richtung basales Ende verschoben und erfahren eine terminale Differenzierung zu fußspezifische Zellen. Dabei verändern die Zellen bereits im Stiel ihre Form. Die Zellen nehmen an Größe zu und sitzen dichter gepackt. Der Golgi-Apparat und Teile des Endoplasmatischen Retikulums werden vergrößert (Burnett, 1966). Doch noch sind die Zellen nicht terminal differenziert, was Transplantationsexperimente aus unterschiedlichen Schichten der Stielregion belegten (Kobayakawa und Kodama, 2002). Erst wenn die Zelle den Transdifferenzierungspunkt, der oberhalb der Fußscheibe liegt passieren, differenzieren die Zellen endgültig. Dabei machen die Epithelzellen eine letzte drastische Veränderung ihrer Form und Funktion durch. Ektodermale Epithelzellen transdifferenzieren zu Basalscheibenzellen, in denen bis zu sechs verschiedene sekretorische Vesikel gefüllt mit sauren Mukopolysacchariden, nachgewiesen wurden (Philpott et al., 1966; Davis, 1973).

Die Zellen der Gastrodermis verändern sich beim Eintritt in die Fußscheibe kaum. Sie reduzieren die Anzahl der Mikrovilli und pinozytotischen Vesikeln (Davis, 1975).

1.2.2 Die Fußbildung während der Regeneration

Die zeitliche Dauer der Fußregeneration ist positionsabhängig. Die Regeneration ist in Nähe der ursprünglichen Fußscheibe temporär schneller als die Regeneration in weiter distal gelegenen Regionen (MacWilliams et al., 1974; Schmidt und Schaller, 1976).

Die Regeneration beginnt mit dem Wundverschluss innerhalb der ersten beiden Stunden (Mattes, 1925). Dabei ist hauptsächlich die Endodermis für eine schnelle Kontaktaufnahme

der Wundränder verantwortlich. Sie bildet eine kompakte Zellschicht aus dicken Entodermiszellen (Kanajew 1930). Zu diesem Zeitpunkt besteht die Ektodermis aus dünnen abgeflachten Zellen, die später die normale, säulenförmige Morphologie zeigen. Die Bildung der Mesogloea erfolgt erst, wenn eine neue Ektodermis gebildet wurde (Bibb und Campbell, 1974; Shimizu et al., 2002).

In halbierten Polypen können erste Fußzellscheiben mittels einer fußspezifischen Peroxidase bereits nach 20-22 Stunden nachgewiesen werden (Hoffmeister und Schaller, 1985). Die Peroxidase ist ein Marker für fußspezifische Drüsenzellen und ihr Nachweis korreliert mit der fußspezifischen Sekretabgabe und der Rückgewinnung der Haftfähigkeit an das Substrat. Spätestens nach 36 Stunden ist die Fußscheibe vollständig regeneriert (Hoffmeister und Schaller, 1985). Bei der Fußregeneration handelt es sich um Morphallaxis, da bei dem Vorgang keine Mitose im regenerierenden Gewebe stattfindet (Mattes, 1925; Kanajew, 1930).

Bei halbierten Polypen wird zunächst die Fußscheibe regeneriert, bevor der Stiel gebildet wird. Dies bedeutet, dass Zellen nicht erst durch den Stiel wandern müssen, um zu Fußscheibenzellen zu differenzieren (Bridge et al., 2000).

Ferner fördert ein intakter Kopf die Fußbildung durch Erniedrigung des Positionswertes im regenerierenden Gewebe (Müller 1990). Umgekehrt wird die Fußbildung durch eine vorhandene Fußscheibe, und sei es nur ein Fragment derselben, gehemmt (McWilliams und Kafatos, 1968).

1.2.3 Die Fußbildung bei der Knospung

Die Fußentwicklung der Knospe beginnt in Stadium 8 mit Einschnürung an ihrem proximalen Ende nahe der Kontaktstelle zum Muttertier (Otto und Campbell, 1977). Lichtmikroskopisch können erste durchsichtige Fußscheibenzellen im Ektoderm am proximalen Ende der Knospe ab Stadium 9 detektiert werden. In diesem Stadium sind die Körperhöhlen von Knospe und Muttertier noch miteinander verbunden (Otto und Campbell, 1977). Mit fortlaufender Abschnürung des Polypen vom Muttertier bildet sich die Fußscheibe aus. Ist die Fußscheibe ausgebildet, kann sich der Jungpolyp von der Knospe ablösen.

1.2.4 Die chemisch induzierte Fußbildung

Zwei verschiedene Effekte können bei der chemisch induzierten Fußbildung beobachtet werden: (I) die ektopische Fußbildung und (II) die Fußbildung am apikalen Ende durch Polaritätsumkehr.

1.2.4.1 Die ektopische Fußbildung durch Lithium-Chlorid

Eine Langzeitinkubation mit 1 mM Lithium-Chlorid führt bei *H. vulgaris* zur Bildung von ring- und fleckenförmigen, ektopischen Füßen sowie großen gürtelartigen Fußstrukturen entlang der Körperachse (Hassel et al., 1993). Nach siebentägiger Inkubation erscheinen im unteren Drittel transversale Abschnürungen. Seltener sind diese Einschnürungen in Kopfnähe zu finden. In den folgenden Tagen differenziert das Gewebe ober- oder unterhalb der Abschnürung zu Fußscheibengewebe. In seltenen Fällen kommt es zur vollständigen Trennung der beiden Hydrahälften (Hassel und Berking, 1990).

1.2.4.2 Die Fußbildung durch Polaritätsumkehr

Eine Polaritätsumkehr der Kopfregion bei *Hydra* kann durch eine Vielzahl von Chemikalien induziert werden. Unterschieden werden zwei Effekte: (I) eine Umgestaltung einer intakten Kopfregion in eine Fußregion und (II) die Fußbildung anstelle einer Kopfregeneration.

Oligomycin war die erste Chemikalie die eine Polaritätsumkehr einer intakten Kopfregion bei *Hydra littoralis* induzieren konnte (Hornbruch und Wolpert, 1975). Eine 24 stündige Inkubation mit Oligomycin führt zu einem Verlust der Tentakel. In den darauf folgenden 24 Stunden bildet sich die distale Region des Polypen zu einer Stielregion um. Nach 72 Stunden besitzen 80% der Tiere am distalen Ende einen zweiten Fuß. Im weiteren Verlauf ist der Gastralraum in zwei Knospungszonen unterteilt (Hornbruch und Wolpert, 1975).

Setzt man Colchicin, Colcemid und Puromycin während der Kopfregeneration ein kommt es zu einer Polaritätsumkehr des apikalen Endes. Colchicin in geringer Konzentration inhibiert und reduziert die Tentakelbildung bei Regeneration (Sturtevant et al., 1951; Croff und Burnett, 1969). Eine lange Inkubationszeit mit einer geringen Konzentration oder eine kurze Inkubationszeit mit hoher Konzentration führen zur Regeneration eines Fußes am distalen Ende (Croff und Burnett, 1969). Colcemid und Puromycin weisen ähnliche Ergebnisse auf, wobei Puromycin eine schwächere Wirkung als Colcemid besitzt (Webster, 1967). Auch Dithiothreitol (DTT) induziert die distale Fußbildung während der Kopfregeneration bei *Hydra littoralis*. Das Entfernen des Hypostoms reicht aus damit bei der folgenden Regeneration in der Kopfregeneration die Ausbildung einer Fußscheibe induziert wird.

Dabei reicht die Entfernung des Hypostoms aus, um bei der Regeneration die Bildung einer Fußscheibe zu induzieren (Hicklin et al., 1969).

Eine Langzeitbehandlung mit LiCl induziert nicht nur die Bildung ektopischer Füße, sondern unterdrückt auch die Kopfregeneration bei *Hydra vulgaris*. Eine Vorinkubationszeit von vier

Tagen vor der Kopfregeneration ist entscheidend. Im Folgenden regeneriert der Polyp anstelle eines Kopfes einen Fuß (Hassel et al., 1993).

Eine spontane Umkehrung der Polarität hat Müller (1995) bei wohlgenährten Hydren beobachtet. Werden bei Polypen mit fünf und mehr Knospen zunächst der Kopf und der Fuß entfernt und die Tiere anschließend so gedrittelt, dass alle Knospen im mittleren Drittel zu finden sind, entsteht an beiden Schnittstellen ein Fuß. Dies ist auf die Fähigkeit der Knospe zurückzuführen, die Fußentwicklung zu unterstützen (Müller, 1995).

1.2.5 Die molekulare Steuerung der Fußbildung

Die Fußbildung wird durch den Fußinhibitor“ (FI) und den „Fußaktivator“ (FA) molekular gesteuert (Schmidt und Schaller 1976; Grimmelikhuijzen und Schaller, 1977). Der Fußinhibitor hemmt schon in geringen Mengen die Fuß- aber nicht die Kopfregeneration. Das Molekül ist kein Peptid, hat ein Molekulargewicht von weniger als 500 Da und hat einen hydrophilen, leicht basischen Charakter (Schmidt und Schaller 1976). Der FA beschleunigt die Fußregeneration. Die Inkubation mit aufgereinigtem FA verursachte einen leichten Anstieg der Proliferation von epithelialen und interstitiellen Zellen sowie die Produktion von Nervenzellen. Die FA-Aktivität verteilt sich gradiert entlang der Körperachse: in Fußnähe am höchsten und in Kopfnähe am niedrigsten (Hoffmeister, 1989). Später wurden aus einem Zellextrakt von *Hydra vulgaris* die Peptide Pedin und Pedibin biochemisch aufgereinigt und identifiziert (Hoffmeister, 1996). Fast zeitgleich wurden in einem groß angelegten Massenscreening nach bioaktiven Peptiden, die zu Pedin und Pedibin identische Peptide Hym-330 und Hym-346 aus *Hydra magnipapillata* isoliert (Takahashi et al., 1997). Von Pedin und Pedibin wird angenommen, dass sie einige Eigenschaften mit dem Fußaktivator gemein haben, da sie die Fuß- aber nicht die Kopfregeneration beschleunigen (Hoffmeister, 1996; Hoffmeister-Ullerich, 2001).

1.2.5.1 Gene zur Differenzierung von fußspezifischen Gewebes

Hym-346/Pedibin besitzt eine Schlüsselrolle in der Differenzierung von fußspezifischem Gewebe (Hoffmeister-Ullerich, 2001). Das Gen ist im Fuß exprimiert. Die gradierte Verteilung des Hym-346/Pedibin Peptids entlang des Stiels führt zu einer Erniedrigung des Positionswerts und induziert die Expression des Transkriptionsfaktors *CnNK-2* (Grens et al., 1999). *CnNK-2* ist ein Homeobox Gen, das sowohl die Expression von *Hym-346/Pedibin*, als auch durch Rückkopplung die eigene Expression steuert. Die Fähigkeit zur Autoregulation ermöglicht es, die eigene Funktion unabhängig von äußeren Faktoren aufrecht zu erhalten,

und agiert somit als molekulares Gedächtnis. Möglicherweise reguliert CnNK-2 auch Gene die direkt in die fußspezifische Differenzierung von Zellen beteiligt sind (Thomsen et al., 2004).

Des Weiteren hemmt Hym-346/Pedibin die Expression von *Fram-1* (Fuß Aktivator reagierende Matrix Metalloprotease) einer Astacin Metalloprotease (Kupfermüller et al., 1999). Die Expression von *Fram-1* ist auf die Gastralregion beschränkt. Da eine Fußregeneration eine starke Umbildung des vorhandenen Gewebes benötigt, wird angenommen, dass die proteolytische Aktivität der Metalloprotease durch die Modellierung des Mikroumfeldes der epithelialen Zellen deren Schicksal in Richtung Gastral- bzw. Fußdifferenzierung beeinflusst (Kupfermüller et al., 1999).

Neben *Fram-1* sind noch zwei weitere Metalloproteinasen bekannt, die die Fußmorphogenese beeinflussen. *Hydra* Metalloproteinase 2 (HMP2) ist eine Astacin Metalloproteinase, die mit Proteinen der Meprin Untergruppe verwandt ist (Yan et al. 2000). Sie beeinflusst nicht nur die Fußregeneration, sondern ist möglicherweise auch an anderen Prozessen beteiligt, da sie nicht nur in der Grenzzone zwischen Körpersäule und der Fußregion exprimiert wird (Yan et al. 2000). Die Metalloproteinase aus *Hydra magnipapillata* *HMMP* wird entlang der Körperachse, jedoch besonders stark in den Zelldifferenzierungsregionen wie dem apikalen und basalen Körperende exprimiert. Sie besitzt, wie alle Metalloproteinasen die Fähigkeit Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) wie Laminin zu verdauen. Aufgrund dieser Fähigkeit wird spekuliert, dass HMMP durch den Umbau der ECM bei der Fußbildung eine Rolle spielt (Leontovich et al., 2000).

Ein weiteres Peptid, das die Fußregeneration beschleunigt, ist Hym-323. Das Peptid ist in entodermalen und ektodermalen Epithelzellen entlang des gesamten Polypen mit Ausnahme des Fußes nachweisbar (Harafuji et al., 2001). Möglicherweise wird durch die Initiierung der Fußbildung Hym-323 frei gesetzt. Das Peptid soll an Rezeptoren der Zellen binden, die das Peptid frei setzen und so die Differenzierung der Fußscheibe induzieren (Harafuji et al., 2001).

Die Rezeptor Tyrosinkinase HTK-7, eine dem Insulinrezeptor aus *Drosophila* und aus Vertebraten verwandte Kinase ist möglicherweise an der Differenzierung von Zellen aus dem Stiel in fußscheibenspezifischen Zellen beteiligt (Steele et al., 1996). HTK-7 ist ubiquitär exprimiert, mit einer erhöhten Expression an der Tentakelbasis und in einem Ring direkt oberhalb der Fußscheibe. Es wird davon ausgegangen, dass abgeleitet von der Expressionsstärke, eine niedrige Kinasekonzentration, wie sie in der Körpersäule vorkommt, die Zellproliferation positiv beeinflusst. Im Gegensatz dazu induziert eine hohe Konzentration, wie sie in den Tentakelbasen und oberhalb der Fußscheibe nachzuweisen ist, eine Differenzierung zu teilungsunfähigen Zellen (Steele et al., 1996). *Shin guard* ist eine weitere RTK, die gradiert im Stiel exprimiert wird mit der stärksten Expression an der Grenze

zur Fußscheibe (Bridge et al., 2000). In der Fußscheibe selbst ist keine Expression nachzuweisen. Während der Fußregeneration kommt es zu einer *shin guard* Expression, die einer *manacle* Expression folgt. *Manacle* wiederum ist ein Homeobox Gen und wird ausschließlich im Fuß exprimiert. Die Expression von *manacle* erscheint in Zellen, die in die Fußscheibe einwandern, zu dem Zeitpunkt, wenn die Zellen ihre fußspezifische Gestalt annehmen (Bridge et al., 2000).

1.2.5.2 Die molekulare Grundlage der Fußbildung während der Knospung

Man geht davon aus, dass an der Fußbildung während der Knospung mindestens zwei verschiedene Proteinkinasen beteiligt sind: eine C-Typ und eine nicht C-Typ Kinase. Zu diesem Schluss kamen Pérez und Berking (1994), als sie durch die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) mit 1,2-Dioctanoyl-*rac*-Glycerol oder 12-o-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat, sowie durch die Inhibierung von verschiedenen Proteinkinasen die Ablösung der Knospen verhinderten. Dabei verbleibt die Knospe am Muttertier und bildet eine zweite Achse aus. Zur Fußbildung an der Knospe kommt es nur in seltenen Fällen. Dann entsteht ein Fußfleck seitlich, an der zum Substrat zu gewandene Seite (Pérez und Berking, 1994). Zu einem ähnlichen Ergebnis führt auch die Inhibierung eines Rezeptor für Fibroblasten Wachstumsfaktoren entweder mit dem spezifischen Inhibitor SU5402 oder durch Elektroporation mit Phosphorothioat-Antisense-Oligonukleotide (Sudhop et al., 2004).

1.3 Funktionelle Untersuchungen bei *Hydra*

Zur Funktionsanalyse von Genen bei *Hydra* kommen verschiedene Methoden der Entwicklungsbiologie zum Einsatz.

1.3.1 Die genetische Funktionsanalysen

Das erste groß angelegte Screening nach mutanten *Hydra*-Stämmen unternahm Sugiyama (Sugiyama und Fujisawa, 1977a). Um Hydren mit ausgeprägten Mutationen zu finden, kreuzte er Polypen gleicher Fundorte untereinander. Von den so erhaltenen Nachkommen züchtete er mittels asexueller Vermehrung neue Stämme. Die Kreuzungsversuche, die mit sexuell produzierten Nachkommen durchgeführt wurden, waren mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden. Daraus folgerte Sugiyama, dass *Hydra* eine große Menge rezessiv letaler Merkmale besitzt (Sugiyama und Fujisawa, 1977a). Unter den *Hydra*-

Stämmen, die Sugiyama identifizierte waren unter anderem Mutanten mit Variationen der Körpergröße wie *mini-4* oder *maxi-1*, sowie regenerationsdefiziente Stämme wie *reg 16* (Sugiyama und Fujisawa, 1977a; 1977b).

Für die meisten *Hydra*-Stämme ist die klassische Kreuzungsmethode zur Identifizierung von *Hydra*-Mutanten sehr schwierig. Das Hauptproblem liegt darin, ausreichende Mengen an *Hydra*-Embryonen zu erhalten. Grund dafür ist eine geringe Eierproduktion und eine lange Embryonalentwicklung von 2 – 24 Wochen. Hinzu kommt die hohe Mortalitätsrate der Embryonen (Zihler, 1972; Moore und Campbell, 1973; Sugiyama und Fujisawa, 1977a).

1.3.2 Transgene Hydren

Eine bewährte Methode zur Funktionsanalyse in der Entwicklungsbiologie ist das Erzeugen transgener Tiere. Dabei wird gezielt ein Allel des zu untersuchenden Gens durch Mutation funktionsunfähig gemacht. In einer darauf folgenden Kreuzung werden defiziente Nachkommen erzeugt, die homozygot für dieses Allel sind. An ihnen kann aufgrund von möglichen Ausfallerscheinungen auf die Funktion des mutierten Gens geschlossen werden.

Bisherige Versuche mit transgenen Hydren waren wenig erfolgreich. Zwar gelang es immer wieder exogene DNA durch Elektroporation (Übersicht in Steele, 2002) oder mittels einer Goldpartikelkanone (Robertson, 1997) in Zellen von adulten Polypen einzuschleusen. Die Expression der induzierten exogenen DNA war jedoch nur gering und das Konstrukt ging nach einigen Tagen verloren. Erst Miljkovic gelang es GFP-Konstrukte unter einem homologen bzw. einem heterologen Promotor in ausreichender Menge in *Hydra* zu exprimieren (Miljkovic et al., 2002). Die ersten stabilen transgenen Polypen wurden mittels Mikroinjektion von Embryonen im zwei bis acht Zellstadium erzeugt (Wittlieb, et al., 2006).

1.3.3 Die Blockierung der Genexpression durch antisense-Oligonukleotide

Die Inhibition der Genexpression mittels antisense-Oligonukleotiden wurde Ende der 70er Jahre erstmals beschrieben und seitdem in vielen Organismen erfolgreich eingesetzt (Stephenson und Zamecnik, 1978). Ein kurzes synthetisches Oligonukleotid, das komplementär zu einem spezifischen Gen ist, bildet Watson-Crick Basenpaarungen mit der homologen mRNA aus und inhibiert so die Translation des Proteins. Ein großer Nachteil dieser Methode sind unspezifische Effekte, die mittels geeigneter Kontrollen ausgeschlossen werden müssen (Wagner, 1994). Der zu erwartende Effekt ist reversibel und hält nur kurz an. Bei *Hydra* wurde diese Technik bereits erfolgreich eingesetzt (Deutzmann et al., 2000;

Fowler et al., 2000; Zhang et al., 2001). Durch die Lokalelektroporation Prozedur (LEP) von regenerierenden Polypen mit antisense Oligonukleotide wurde die Beteiligung eines Endothelin-konvertierenden Enzyms bei der Fußregeneration (Zhang et al., 2001) und die Funktion zweier Kollagene bei der Kopfentwicklung nachgewiesen (Deutzmann et al., 2000; Fowler et al., 2000). Reproduzierbare Effekte von antisense Oligonukleotiden konnte auch durch Ganztier Elektroporation erzeugt werden (Sudhop et al., 2004).

1.3.4 Die RNA Interferenz Methode

Seit ihrer Entdeckung durch Fire im Jahre 1998 hat sich die RNA Interferenz (RNAi) Methode in kürzester Zeit zu einer weit verbreitete Technologie der molekularen und zellbiologischen Forschung entwickelt. Die Methode beruht auf dem Mechanismus der posttranskriptionalen Inaktivierung von Genen und wird durch exogene oder endogene doppelsträngige RNA (dsRNA) ausgelöst (Abb. 4) (Montgomery et al., 1998). Als Auslöser können experimentell exprimierte dsRNA, irrtümlich exprimierte Transgene, RNA-Viren, Transposons oder endogene RNAs, die eine Haarnadelstruktur besitzen, fungieren (Hammon, 2002). Experimentell kann die dsRNA durch Mikroinjektion (Fire et al., 1998), Elektroporation (Ngo et al., 1998) oder durch die Nahrung (Timmons und Fire et al., 1998) in den Zielorganismus gebracht werden. In der Zelle wird sie dann durch das Protein Dicer in kurze 21 – 23 Basenpaar lange Fragmente (short interference RNA, siRNA) zerlegt (Hamilton und Baulcombe, 1999; Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Im weiteren Verlauf wird ein einzelner siRNA-Strang in den „RNA induzierten Gen-Inaktivierungs-Komplex“ (RNA induced gene-silencing complex, RISC) einem Multiproteinkomplex, eingebaut (Hammond et al., 2000; Nykanen, 2001; Martinez et al., 2002). Mittels der eingebauten siRNA findet RISC spezifisch die homologe Stelle auf der mRNA, bindet und schneidet den neu entstanden Doppelstrang in der Mitte (Elbashire et al., 2001; Martinez et al., 2002).

Neben diesem grundlegenden Mechanismus wurde in einige Organismen die Phänomene der transitiven und der systemischen RNAi beobachtet. Bei der transitiven RNAi dienen siRNAs als Primer für eine RNA abhängige RNA Polymerase, kurz RDRP (Sijen et al., 2001). Nachgewiesen wurde dieser Effekt bei *C. elegans* und Pflanzen (Vaistij et al., 2002). Für eine systemische RNAi gibt es keine direkten Hinweise, aber es gibt Indizien. So ist bekannt, dass ein RNAi Effekt bei *C. elegans* ausgelöst werden kann, wenn dieser Bakterien, die dsRNA synthetisieren, als Nahrung aufnimmt (Timmons und Fire, 1998). Ein weiterer Anhaltspunkt ist die Tatsache, dass *C. elegans*, wegen der kurzen Generationszeit, einen RNAi Effekt an seine direkten Nachkommen weiter geben kann (Timmons et al., 2001). In beiden Fällen muss ein Transportsystem vorhanden sein das den Effekt auf Zellen

im ganzen Körper und auch auf Keimbahnzellen verteilen kann. Zusätzlich muss es zu einer Vervielfältigung des RNAi Effektes kommen. Dies könnte über eine transitive RNAi erfolgen.

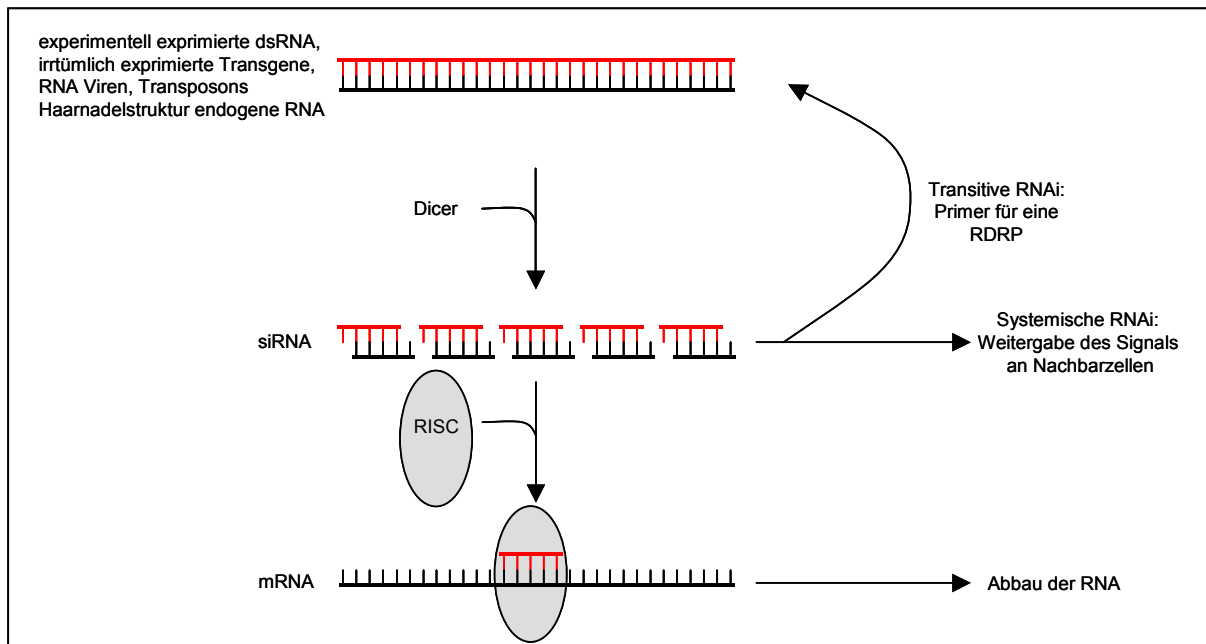


Abb. 4: Der dsRNA induzierter Geninaktivierungsmechanismus der RNAi. Der Ursprung der dsRNA kann entweder endogen, viral oder exogen sein. Die dsRNA wird von Dicer zu der siRNA prozessiert. Diese wird in den RISC eingebaut und dirigiert den Multiproteinkomplex zur homologen mRNA, die daraufhin prozessiert wird. Bei einer transitägen RNAi kann die siRNA als Primer für eine dsRNA-abhängige RNA Polymerase (RDRP) dienen. Im Falle einer systemischen RNAi kommt es zu einem Transport des RNAi Phänomens zwischen den Zellen kommt.

Die vergleichsweise einfache Handhabung der RNAi zur temporären Geninaktivierung hat für eine rasche Verbreitung bei der Arbeit mit verschiedenen Modellorganismen geführt.

Bei *Hydra* wurden zwei verschiedene Methoden beschrieben dsRNA in den Organismus einzubringen. Lohmann elektroporierte 60 ganze Hydren mit dsRNA des kopfspezifischen Gens *ks1*. Nach sechs Tagen, die der Regeneration der Polypen nach dem Elektroporieren dienten, wurde der eigentliche Kopfreparationsversuch durchgeführt. Dazu wurde den Polypen der Kopf abgetrennt und bei der folgenden Regeneration eine Verzögerung der Kopfbildung bei den mit *ks1* dsRNA elektroporierten Tieren beobachtet (Lohmann et al., 1999).

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung des zu *aristaless* verwandten Gens *HyAlx* während der Tentakelbildung bei der Knospung verwendete Smith die lokale Elektroporationsprozedur (Smith et al., 2000). Einzelnen Polypen mit einer Knospe in Stadium 2 – 3 nach Otto und Campbell (1977) wurde eine Glaskapillare übergestülpt, die das Medium mit der dsRNA und eine Elektrode enthielt. Die zweite Elektrode befand sich im den Polypen umgebenden Medium. Nach dem Puls wurden bei den mit *HyAlx* dsRNA behandelten Tieren eine Verzögerung der Tentakelbildung von bis zu 48 Stunden nachgewiesen (Smith et al., 2000).

1.4 Ziel der Arbeit

Das hervorragende Regenerationsvermögen von *Hydra vulgaris* ermöglicht dem Süßwasserpolyphen fehlende Körperteile, wie Kopf oder Fuß binnen kürzester Zeit neu zu bilden. Diese faszinierende Fähigkeit erlaubt die Untersuchung entwicklungsbiologischer Prozessen direkt am lebenden Tier. Dabei war die Kopfbildung das bevorzugte Ziel der Untersuchungen der letzten Jahre. Über die Musterbildungsprozesse während der Fußbildung ist nur wenig bekannt.

In der vorliegenden Promotionsarbeit sollten Gene identifiziert werden, die bei der Fußbildung beteiligt sind. Dazu wurden Transkripte aus zwei Expressionsscreenings ausgewählt und molekularbiologisch und funktionell charakterisiert.

Zur funktionellen Untersuchung der Gene sollte die RNA Interferenz Methode benutzt werden. Als Grundlage diente die bei *Hydra* etablierte RNAi Methode von Lohmann (Lohmann et al., 1999). Durch den Einsatz verschiedenster Elektroporationsverfahren und den daraus resultierenden unterschiedlichen elektrischen Feldern, sollte eine möglich sanfte Methode gefunden werden, die dsRNA in die Tiere einzubringen.

2 Ergebnisse

2.1 Die Identifikation von cDNAs aus zwei Expressionsscreenings

Aus den Expressionsscreenings einer LiCl induzierten cDNA Bank, die von A. Bieller (1997) bzw. von M. Klenk (1999) durchgeführt wurden, wurden 34 Transkripte ausgewählt und ansequenziert. Die Sequenzen sind im Anhang unter 7.1 beigefügt. Aufgrund ihrer Expression konnten sie in zwei Gruppen untergliedert werden: Ganztierfärbung und Tiere mit regionaler Expression. Zur Gruppe mit einer Ganztierfärbung gehören 18 Transkripte (Tabelle 1). Exemplarisch für eine Ganztierfärbung sei hier die Expression von *MK66* gezeigt (Abb. 6). Die Sequenzanalyse zeigte, dass nahezu alle cDNAs Ähnlichkeiten zu Haushalts-Genen der Zelle hatten. *MK28* und *MK52* sind identisch mit der Sequenz für den Elongationsfaktor 1-alpha, der bereits früher in *Hydra vulgaris* identifiziert worden war (Schröder, 1995). Die cDNAs *MK19* und *MK57* zeigen Sequenzähnlichkeiten mit 40S ribosomalen Proteinen und könnten in der Translationsinitiation involviert sein. Drei Transkripte zeigen Sequenzähnlichkeiten mit Nukleasen, dem mRNA Turnover Protein 4 (*MK12*), einer 20 kDa Exonuklease (*MK16*) und einer Staphylokokken Nuklease (*MK51*).

Die Proteine *MK71* und *MK62* scheinen an der Proteinfaltung bzw. am Abbau beteiligt zu sein. *MK71* hat Sequenzähnlichkeit mit Cyclophilin, einer Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (PPIase). Dieses Enzym katalysiert die langsam ablaufende cis-trans Isomerisierung von Prolinpeptidbindungen in Oligopeptiden und beschleunigt die Faltung einzelner Proteine (Fischer und Bang, 1985; Bachinger, 1987; Lang et al., 1987; Lang und Schmid, 1988). *MK62* kodiert möglicherweise eine Untereinheit des 26S Protease Komplexes. Dieser Komplex ist in der ATP/Ubiquitin abhängigen Proteolyse von Proteinen beteiligt (Hershko und Ciechanover, 1992).

MK40 und *MK66* haben Sequenzähnlichkeit mit Hitzeschockproteinen und dienen somit dem Schutz der Zelle gegenüber schädlichen Einflüssen, wie zu hoher Temperatur. Auch das Transkript *MK45* scheint der Sicherheit der Zelle zu dienen. Es hat Sequenzähnlichkeit mit einer Glutathion Peroxidase, welche schädliche reaktive Sauerstoffverbindungen wie Superperoxidanionen, Hydroxywasserstoff und Hydroxylradikale, die bei der aeroben Atmung der Zelle anfallen, beseitigt (Matés et al., 1999).

Das Transkript *MK58* ist identisch mit dem Aktin von *Hydra vulgaris* (Fischer und Bode, 1989). Aktin bildet dynamische Filamente aus, die als Bestandteil des Zytoskeletts zur Stabilisierung der äußeren Zellform dienen. Daneben dienen Aktinfilamente auch dem intrazellulären Transport (Alberts et al., 1997).

Tabelle 1: Transkripte mit einer Ganztierfärbung

Transkript	Größe [bp]	Sequenzähnlichkeit mit
Me27	1260	keine signifikante Ähnlichkeit
MK11	548	Ionenkanal
MK12	1652	mRNA turnover protein 4 homolog
MK16	683	Interferon stimulierende 20 kDa Exonuklease
MK19	852	40s ribosomales Protein s4
MK25	1325	keine signifikante Ähnlichkeit
MK28	1186	Elongationsfaktor 1-alpha
MK31	1732	keine signifikante Ähnlichkeit
MK40	1930	Hitzeschock Protein
MK45	605	Glutathion Peroxidase
MK51	3335	SND1 Nuklease Domäne enthaltenes Protein 1
MK52	2036	Elongationsfaktor 1-alpha
MK57	912	40s ribosomales Protein S9
MK58	1481	Aktin Hydra attenuata
MK62	1632	26S Protease
MK66	1005	Hitzeschock Protein hsp 90
MK71	1220	Peptidyl cis-trans Isomerase
MK74	1381	keine signifikante Ähnlichkeit

MK11 zeigt Sequenzähnlichkeit mit einem Ionenkanal, der durch Hyperpolarisierung aktiviert wird und eine Bindestelle für zyklische Nukleotide besitzt. Mitglieder dieser Ionenkanalfamilie kommen in den Schrittmacherzellen von Herz und Gehirn vor (Santoro et al., 1998; Krieger et al., 1999).

Vergleiche der Transkripte *Me27*, *MK25*, *MK31* und *MK74* mit Datenbanken zeigten keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinsequenzen.

Die verbleibenden 16 Transkripte haben ein regional verteiltes Expressionsmuster (Abb. 6). Für sieben Transkripte (*MK13*, *MK21*, *MK33*, *MK35*, *MK36*, *MK37* und *MK54*) konnte bei der Sequenzanalyse keine Übereinstimmung mit bekannten Proteinsequenzen aus Datenbanken gefunden werden. Fünf der Transkripte zeigten Ähnlichkeit mit Genen des Zellstoffwechsels. So sind *MK68*, *MK85* und *MK99* möglicherweise an der Proteinsynthese beteiligt. *MK68* hat Ähnlichkeit mit dem 40S ribosomalen Protein S3 und könnte deshalb an der Translation von Proteinen beteiligt sein. Die cDNA *MK85* ist dem Calumenin ähnlich. Calumenin ist ein Ca²⁺ bindendes Protein im endoplasmatischen Retikulum und dort an der Faltung von Proteinen beteiligt (Yabe et al., 1997). *MK99* scheint an der Beladung von tRNAs mit Aminosäuren beteiligt zu sein, da es Sequenzähnlichkeit mit einer Aminoacyl-tRNA Synthetase besitzt.

Das Transkript *MK30* ist möglicherweise an der Glutamin-Biosynthese beteiligt. Die Sequenz zeigt Ähnlichkeit mit einer Glutamin Synthase, welche die Synthese von Glutamin aus Glutaminsäure durch Hydrolyse von ATP katalysiert (Alberts et al., 1995).

MK23 scheint an der aeroben Energiegewinnung der Zelle mitzuwirken. *MK23* besitzt Sequenzähnlichkeit mit der Untereinheit C einer ATPase-Komponente in der mitochondrialen Membran (Yan et al., 1997).

Unter den verbleibenden 4 Transkripten, die aus dem Expressionsscreening ausgesucht wurden, sind drei cDNAs (*K10-7*, *MK55* und *MK97*), die eine Expression in der Fußregion zeigen (Abb. 6). Da diese Transkripte möglicherweise in der Fußbildung involviert sind, wurde sowohl die Sequenz analysiert, als auch das Expressionsmuster im Detail verschiedenen Entwicklungs- und Regenerationsstadien zugeordnet. Im Anschluß sollte, mittels der RNAi Methode, die Funktion der Gene charakterisiert werden. Daneben wurde das Transkript *MK38* auf Grund seines auffälligen Expressionsmuster zur Charakterisierung ausgesucht. Die Expression ist nicht fußspezifische sondern entodermal, mit Ausnahme des Hypostoms, im ganzen Tier nachweisbar (Abb. 6). Von diesem Transkript wurde die vollständige Sequenz bestimmt und näher charakterisiert.

Nächste Seite

Abb. 6: Expressionsmuster der Transkripte mit regio-spezifischem Muster. Neben der Expression ist die Größe des Transkript und die Sequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen angegeben. Als Beispiel für ein Expressionsmuster der Gruppe Ganztierfärbung wurde das des Transkripts *MK66* hinzugefügt. (Abbildungen aus Klenk (1999) mit Ausnahme von *K10-7*, *MK55* und *MK97*).



MK13
1652 bp
keine signifikante Ähnlichkeit



MK21
2567 bp
keine signifikante Ähnlichkeit



MK23
683 bp
ATP-Synthase



MK30
1964 bp
Glutamin-Synthase



MK33
2023 bp
keine signifikante Ähnlichkeit



MK35
1048 bp
keine signifikante Ähnlichkeit



MK36
1228 bp
keine signifikante Ähnlichkeit



MK37
1111 bp
keine signifikante Ähnlichkeit



MK38
1005 bp
chTOG



MK54
1220 bp
keine signifikante Ähnlichkeit



MK55
1379 bp
Rhamnose-bindendes Lektin



MK68
912 bp
40S ribosomales Proteine S3



MK85
408 bp
Calumenin



MK97
1258 bp
Rhamnose-bindendes Lektin



MK99
2651 bp
Aminoacyl-tRNA-Synthetase



K10-7
955 bp
Tenascin/Teneurin



MK66
1005 bp
Hitzeschock Protein hsp 90

2.1.1 Der Klon *K10-7*

Das Transkript *K10-7* wurde in einem von A. Bieller (1997) durchgeführten Expressionsscreening einer LiCl induzierten cDNA Bank isoliert.

2.1.1.1 Die cDNA-Sequenz von *K10-7* ist vollständig

Die vollständige cDNA-Sequenz von *K10-7* umfasst 955 Nukleotide (Abb. 7). Das Transkript enthält ein einzelnes offenes Leseraster von Nukleotid 68 bis 841 mit einer Länge von 753 Nukleotiden. Auf das offene Leseraster folgt eine 132 Nukleotid große 3' nicht translatierte Region (Abb. 7). Das Start-Codon befindet sich an Position 68 - 70 in der cDNA. Nach Kozak (1987) ist für die effiziente Translation einer mRNA die Sequenzumgebung des Initiations-Codons wichtig. So hat ein potenzieller Translationsstart die Sequenz **CCRCCATGG**, wobei R ein Adenin oder Guanin sein kann. Nach Kozak (1987) sind für die Translationseffizienz die Nukleotide an Position -3 und +3 um das Adenin des Start-Codons, hier kursiv hervorgehoben, besonders wichtig. Das Start-Codon der cDNA zeigt vier Übereinstimmungen mit der optimierten Startsequenz nach Kozak auf. An Position -3 befindet sich ein Adenin und an +3 ein Guanin. Neben diesen für eine effiziente Translation wichtigen Nukleotiden, sind noch an Positionen -1 und -4 weitere Sequenzübereinstimmungen vorhanden. Weitere mögliche Start-Codons befinden sich an Position 29 - 31, 32 - 34 und 44 - 46 in der *K10-7*-Sequenz. Da jedoch die Sequenzumgebung dieser Start-Codons weniger Übereinstimmungen mit der von Kozak postulierten Sequenz aufweist, ist anzunehmen, dass die Translations-Initiation am ATG an Position 68 - 70 stattfindet.

Das Stop-Codon an Position 821 – 823 beschränkt das offene Leseraster, das für ein 254 Aminosäuren großes Peptid mit einem relativen Molekulargewicht von 27,2 kDa kodiert. Ein Polyadenylierungs-Signal wurde an Position 921 - 926, 12 Nukleotide vor dem poly(A)-Schwanz gefunden.

1	CTTGTA																				ACTATTA																				CTAATTATA																				ACGAATGAT																				GAAATTT																				AAAATGCT																				CGCAACTT																				CCTTT																				60																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
																																																												→EGF-1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	M																				G																				T																				I																				F																				Q																				K																				F																				V																				F																				S																				A																				D																				S																				S																				S																				M																				A																				18																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
61	CTT																				CAT																				CAT																				G																				G																				G																				A																				A																				C																				T																				A																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																				T																			

Abb. 7: DNA-Sequenz von K10-7 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotide sind vom 5' zum 3' Ende nummeriert. Die Aminosäuren sind ausgehend vom Methionin des potentiellen Initiations-Codons nummeriert. Das Start-Codon und die Übereinstimmungen mit der Kozak-Sequenz sind unterstrichen. Das Polyadenylierungs-Signal ist grau unterlegt. Der Anfang einer jeden EGF-ähnlichen Domäne ist mit →EGF, das Ende mit einem senkrechten Strich markiert.

2.1.1.2 Die Northern Blot Analyse von *K10-7* zeigt ein Transkript von 1.1 kb

Zur Verifizierung der *K10-7* Transkriptgröße wurde eine Northern Blot Analyse mit poly(A)⁺-RNA und Gesamt-RNA aus knospenlosen, unbehandelten Hydran durchgeführt. Die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten *K10-7*-Sonde erbrachte für die poly(A)⁺-RNA eine einzelne Bande mit einer Größe von 1,1 kb (Abb. 8). Die Größenbestimmung von *K10-7* in der Gesamt-RNA erwies sich als etwas schwieriger. Es wurde eine einzelne Bande, die aber im Vergleich zu der Bande der poly(A)⁺-RNA breiter ausfällt, nachgewiesen. Zur Bestimmung der Größe wurde daher der Mittelpunkt des dunkleren Zentrums der Bande benutzt. Aufgrund der Beschaffenheit der Gesamt-RNA Bande ist die errechnete Bandengröße von 1,1 kb mit Vorbehalt zu behandeln (Abb. 8).

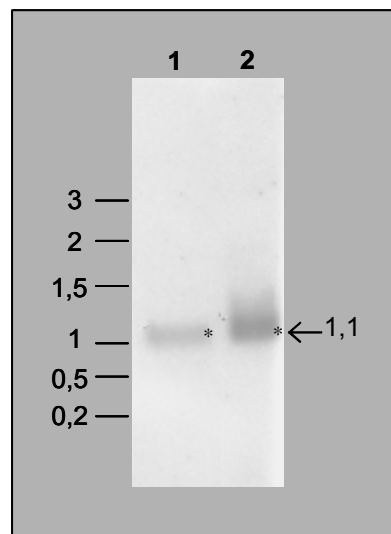


Abb. 8: Northern Blot Analyse des *K10-7* Transkripts. (1) poly(A)⁺-RNA (4 µg) und (2) Gesamt-RNA (20 µg) wurden unter stringenten Bedingungen mit radioaktiv markierter *K10-7* Sonde hybridisiert und jeweils eine einzelne Bande mit der Größe von 1,1 kb detektiert. Die Größe der Markerbanden sind links und die Bandengröße rechts angegeben. Der Mittelpunkt der Banden ist mit einem Stern markiert.

2.1.1.3 K10-7 ähnelt der EGF-ähnlichen Domäne der Tenascine und Teneurine

Die Sequenzanalyse von K10-7 ergab Ähnlichkeiten mit den **E**pidermalen **G**rowth **F**actor (**EGF**) ähnlichen Domänen der Proteinfamilien der Tenascine (TN) und der Teneurine (TEN) (Abb. 9). Tenascine sind lösliche Glycoproteine, die bisher nur in Wirbeltieren identifiziert wurden. Strukturell können die Proteine in vier Domänen unterteilt werden: die Multimerisierungs Domäne, die EGF-ähnliche Domäne, die Fibronectin Typ III (FNIII) Domäne und eine Fibrinogen-ähnliche Struktur. Die EGF-ähnliche Domäne der Tenascine ist aus einer variablen Anzahl von EGF-ähnlichen Motiven aufgebaut. Die Anzahl dieser Motive führt zur Unterteilung in die Untergruppen Tenascin-C, -N, -R, -W, -X und -Y (abgekürzt TN-C, TN-N, TN-R, TN-W, TN-X und TN-Y) (Tabelle 2).

Auch die Größe der FNIII Domäne variiert in der Anzahl der FNIII Sequenzwiederholungen. Die Variationen sind jedoch nicht von den Untergruppen abhängig (Tabelle 2). Von TN-C aus Maus sind zwei Spleißvarianten mit 5 und 15 FNIII Sequenzwiederholungen bekannt (Weller et al., 1991).

Die zweite Proteinfamilie, mit der K10-7 eine Sequenzähnlichkeit aufweist, ist die der membrangebundenen Teneurine. Die ersten Mitglieder dieser Familie, die isoliert wurden waren Ten^a (a wie accessory) und Ten^m (wie major) aus *Drosophila melanogaster* (Chiquet-Ehrismann, 1993; Baumgartner et al., 1994) und wurden fälschlicherweise der Tenascin Familie zugeordnet. In Wirbeltieren konnten bis zu vier Teneurine identifiziert werden. Da einige Mitglieder gleichzeitig von verschiedenen Gruppen identifiziert wurden ist in Tabelle 3 eine Übersicht über die einzelnen Mitglieder mit den alternativen Namen gegeben.

Der Proteinaufbau der Teneurine ist in eine N-terminale Transmembrandomäne, eine EGF-ähnliche Domäne und eine YD-Domäne, die aus mehreren YD-Sequenzwiederholungen besteht, gegliedert (Abb. 9). Die Größe der EGF-ähnlichen Domäne Teneurine ist nicht so variabel wie die der Tenascine. Zusätzlich besitzen die Teneurine Ten^a, Ten2 aus Hühnchen und Ten4/Doc4 aus der Maus zwischen der Transmembrandomäne und der EGF-ähnlichen Domäne eine Schnittstelle für Furin, einer membrangebundene Endoprotease (Wang et al., 1998; Rubin et al., 1999). Eine Besonderheit in seinem Proteinaufbau zeigt Ten2/Neurestatin aus Ratte. Hier befindet sich die Transmembrandomäne zwischen der EGF-ähnlichen Domäne und der FNIII-ähnliche Domäne (Otaki und Firestein 1999a).

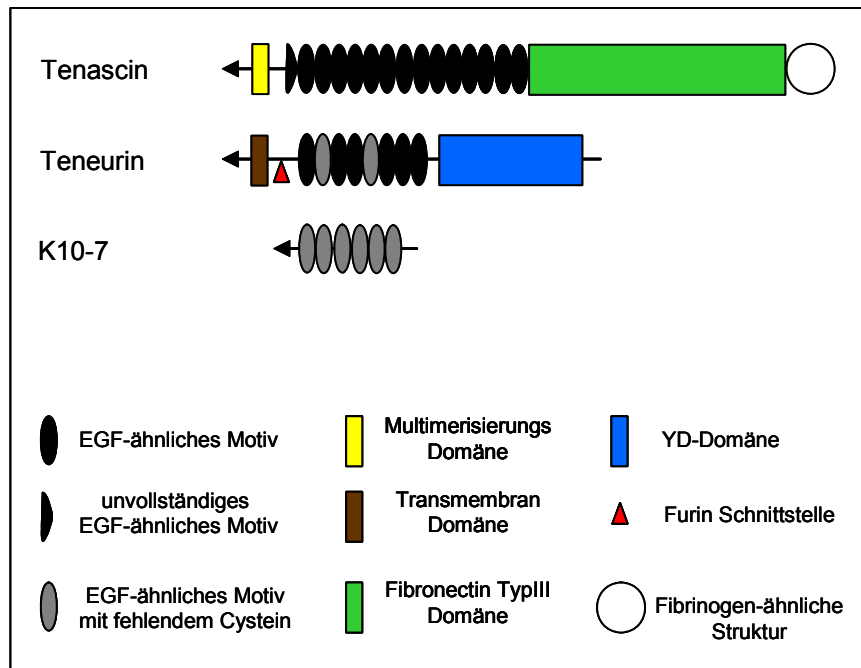


Abb. 9: Schematische Übersicht über den Proteinaufbau der Tenascine, der Teneurine und K10-7.

2.1.1.3.1 Vergleich der EGF-ähnlichen Domäne der Tenascine und Teneurine mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor aus Maus

Die EGF-ähnlichen Motive der Tenascine und Teneurine wurden untereinander und mit dem EGF der Maus verglichen. Die Struktur des EGF von Maus ist in vielen Studien charakterisiert (Übersicht in Davis et al., 1990) und dient als Basis für die Vergleiche der EGF-ähnlichen Motive. Anhand der spezifischen Merkmale der EGF-ähnlichen Domänen der Tenascin und Teneurine wurde anschließend die EGF-ähnliche Domäne von K10-7 konstruiert

Der epidermale Wachstumsfaktor EGF ist ein extrazelluläres lösliches Peptid, das aus einem Vorläufermolekül prozessiert wird (Savage et al., 1973). Zur Veranschaulichung der Struktur soll hier das prozessierte Maus-EGF dienen (Abb. 10A). Das reife EGF-Molekül besteht aus 53 Aminosäuren und besitzt sechs hoch konservierte Cysteine. Dabei kommt es zur Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen Cys6/Cys17, Cys14/Cys28 und Cys30/Cys39, die für die biologische Aktivität des Faktors wichtig sind (Taylor et al., 1972). Um den Vergleich der konservierten Cysteine des EGFs mit den konservierten Cysteinen der EGF-ähnlichen Motive der Tenascine und der Teneurine zu vereinfachen werden die Cysteine Cys6, Cys14, Cys17, Cys28, Cys30 und Cys39 als Cys-1 bis Cys-6 umbenannt (Abb. 10A). Die drei Disulfidbrücken des EGF führen zur Bildung von vier Proteinschleifen, die hier als Proteinschleifen a bis d bezeichnet werden (Abb. 10A).

Neben den sechs Cysteinen sind auch vier Glycine in den Schleifen b und d in den EGF-ähnlichen Motiven konserviert. So finden sich im Maus-EGF in der Proteinschleife b die

Glycine Gly15 und Gly16 und in der Schleife d die Glycine Gly33 und Gly36. Auch diese Glycine sollen der Einfachheit halber umbenannt werden. So werden Gly15 und Gly16 zu Gly-1 und Gly-2 und Gly33 und Gly36 zu Gly-4 und Gly-5. Gly-3 ist ein Glycin, das nur in den EGF-ähnlichen Motiven der Tenascine und Teneurine in der Proteinschleife c vorkommt (Abb. 10A + B).

Die EGF-ähnlichen Motive der Tenascine und Teneurine bestehen aus einer verkürzten EGF Sequenz mit einer ungefähren Größe von 30 AS (Abb. 10B).

Die Verkürzung des EGF-Motivs beruht auf dem Wegfall von Aminosäure am N-terminalen Ende bis zu Cys-1 und am C-terminalen Ende ab Cys-6. Dazu kommt eine Verkürzung der Proteinschleifen a und c. So enthält die Schleife a der Tenascine und Teneurine nur noch drei bis vier anstelle der sieben Aminosäuren des EGFs. Schleife c, die im EGF stark ausgeprägt ist, enthält nur noch drei bis sechs der ehemals zehn Aminosäuren. Die Schleife d besteht immer konstant aus acht Aminosäuren.

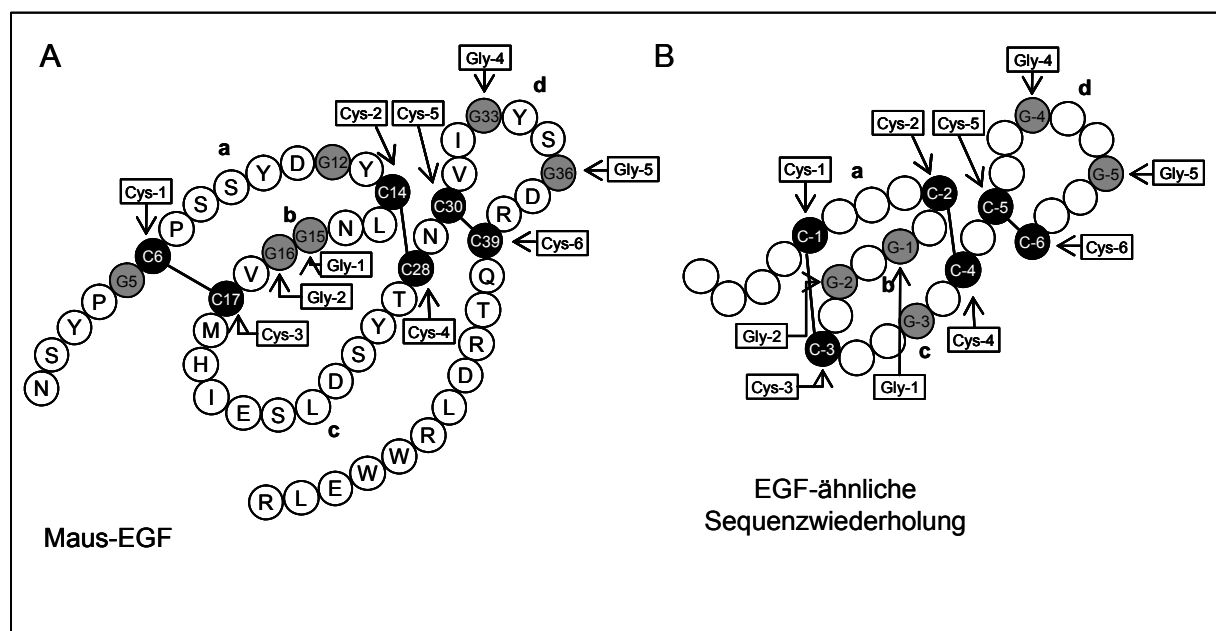


Abb. 10: Schematische Darstellung eines Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) und einem EGF-ähnlichen Motiv. A) Maus-EGF verändert nach Savage et al. (1973) B) häufigste Variante eines EGF-ähnlichen Motivs der Tenascine und Teneurine. Cysteine wurden schwarz und Glycine grau dargestellt. Die Buchstaben a - d bezeichnen die einzelnen Schleifen. C-1 bis C-6 und G-1 bis G-5 stehen für Cys-1 bis Cys-6 und Gly-1 bis Gly-5.

Die EGF-ähnlichen Domänen der Tenascine und Teneurine unterscheiden sich in der Anzahl der EGF-ähnlichen Motive (Tabelle 2 und 3). Die EGF-ähnliche Domäne der Tenascine beginnt immer mit einem halben Motiv, bestehend aus der Sequenz von Cys-4 bis Cys-6. Darauf folgen dann spezifisch für die einzelnen Mitglieder drei (TN-N und TN-W), vier (TN-R), 14 (TN-C) und 18 (TN-X) EGF-ähnlichen Motive. TN-Y bildet eine Ausnahme. Das

einziges vollständige Motiv wird von zwei halben Motiven flankiert. Das C-terminale halbe Motiv besteht nur aus den Cysteinen Cys-5 und Cys-6 (Tabelle 2).

Von TN-N ist bisher nur eine Sequenz aus der Maus bekannt. TN-N und TN-W besitzen eine identische EGF-ähnliche Domäne, unterscheiden sich aber in der Anzahl der FNIII Sequenzwiederholungen (Tabelle 2). Auf Grund der gemeinsamen EGF-ähnlichen Domäne wird in den weiteren Untersuchungen die Sequenz von TN-N vernachlässigt.

Die EGF-ähnliche Domäne der Teneurine ist aus acht EGF-ähnlichen Motiven aufgebaut. Eine Besonderheit der EGF-ähnlichen Domäne der Teneurine gegenüber den Tenascine ist das Fehlen von Cys-3 bei dem zweiten und fünften EGF-ähnlichen Motiv. Alle Teneurine besitzen ein Tyrosin an Stelle des Cys-3 im zweiten EGF-ähnlichen Motiv. Das Cys-3 des fünften Motivs ist durch ein Tyrosin bei Ten1 und Ten4 und gegen ein Phenylalanin bei Ten2 und Ten3 ersetzt.

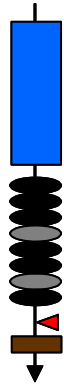
Für Ten2 wurden drei Varianten im Hühnchen identifiziert. Variante 1 enthält nur 7 EGF-ähnliche Motive (Tabelle 3). Der C-terminale Teil fehlt, so dass das Protein nur aus 831 Aminosäuren besteht. Die EGF-ähnliche Domäne der Variante 2 und 3 sind vollständig, wobei Variante 2 zwischen dem siebten und achten EGF-ähnlichen Motiv einen Einschub von acht Aminosäuren besitzt (Tabelle 3). Da die EGF-ähnlichen Domänen dieser drei Varianten bis auf das Fehlen des achten Motivs und dem Einschub der acht Aminosäuren identisch sind, wurde für die folgenden Sequenzvergleiche nur die EGF-ähnlichen Domäne von Variante 3 benutzt.

Tabelle 2: Übersicht über die Proteine der Tenascinfamilie. C-terminale EGF-ähnliche Motive bestehend aus Cys-4 bis Cys-6 wurden mit $\frac{1}{2}(C)$, N-terminale EGF-ähnliche Motive bestehend aus Cys-4 bis Cys-6 wurden mit $\frac{1}{2}(N)$ abgekürzt. Zur Übersicht über die Proteinstruktur befindet sich in der rechten oberen Ecke die schematische Abbildung eines Tenascins (Erklärung der Symbole in Abb. 9).



Tenascine	Acc.-Nr	Größe in AS	Anzahl der EGF-ähnlichen Motive	Anzahl der FNIII Motive	Besonderheit	Referenz
TN-X						
Maus	AB010266	4114	$\frac{1}{2}(C)$ 18	31		Ikuta et al., 1998
Rind	Y11915	4135	$\frac{1}{2}(C)$ 18	30		Eleferiou et al., 1997
Mensch	U89337	3611	$\frac{1}{2}(C)$ 18	29		Bristow, et al., 1993
TN-C						
Zebrafisch	X89203	-	-	3	Partielle Sequenz, besteht nur aus FNIII Ende	Tongiorgi et al., 1995
Huhn	X08030	1808	$\frac{1}{2}(C)$ 14	-		Pearson et al., 1988
Maus	X56304	2019	$\frac{1}{2}(C)$ 14	15	Durch alternatives Spleißen wird FNIII Domäne auf 5 Motive verkürzt	Weller et al., 1991 Sagaet al., 1991
Schwein	X615999	1651	$\frac{1}{2}(C)$ 14	9		Nishi et al., 1991
Mensch	M55618	2003	$\frac{1}{2}(C)$ 14	13		Nies et al., 1991
TN-R						
Zebrafisch	AY286489	1351	$\frac{1}{2}(C)$ 4	9		Becker et al., 2003
Maus	AY353974	1358	$\frac{1}{2}(C)$ 4	9		Carninci und Hayashizaki, 1999
Ratte	Z18630	1356	$\frac{1}{2}(C)$ 4	9	Weitere Namen für TN-R: J1-160/180 Janusin	Fuss et al., 1993
Mensch	Z67996	1358	$\frac{1}{2}(C)$ 4	9		Carnemolla et al., 1996
TN-W						
Zebrafisch	AJ001423	932	$\frac{1}{2}(C)$ 3	5	TN-W Maus fehlen FNIII Domäne 6-9	Weber et al., 1998
Maus	AJ580920	1296	$\frac{1}{2}(C)$ 3	9		Scherberich et al., 2004
TN-N						
Maus	AF455756	1560	$\frac{1}{2}(C)$ 3	12	Identisch mit EGF TN-W von Maus	Neidhardt et al., 2003
TN-Y						
Huhn	X99062	1914	$\frac{1}{2}(C)$ 1 $\frac{1}{2}(N)$	12		Hagios et al., 1996

Tabelle 3: Übersicht über die Proteine der Teneurinfamilie. Beschreibung im Text. Zur Übersicht über die Proteinstruktur befindet sich in der rechten oberen Ecke die schematische Abbildung eines Teneurins (Erklärung der Symbole in Abb. 9).



Teneurine	Acc.-Nr	Größe in AS	Besonderheit	Referenz
Teneurin-1				
Huhn TEN1 (ten-1)	AJ23861	2705		Minet et al., 1999
Maus Ten1 (ten m1/odz-1/odz-3)	NM 01185	2731		Oohashi et al., 1999
Mensch TEN1	NP 055068	2705		Minet und Chiquet-Ehrismann, 2000
Teneurin-2				
Huhn TEN2 (ten2)	AJ245711 - AJ279031	Variante1: 831 Variante2: 2774 Variante3: 2774	Variante1: 7 EGF-ähnliche Motive, ohne C-terminale Ende Variante2: 8 EGF-ähnliche Motive, Einschub von 8 AS Variante3: 8 EGF-ähnliche Motive	Rubin et al., 1999 (Tucker et al., 1999)
Maus Ten2 (ten m2/odz-1/odz-2)	NM 011856	2764		Rubin et al., 1999 (Ben-Zur und Wides, 1999 / Ben-Zur et al., 2000)
Ratte Ten2 (neurestin)	AF086607	2765	Die Transmembrandomäne liegt hinter der EGF-ähnlichen Domäne	Otaki und Firestein 1999a und b
Mensch TEN2	-	-	Nur C-terminaler Teil	Minet und Chiquet-Ehrismann, 2000
Teneurin-3				
Zebrärfisch TEN3 (ten-m3)	AB026979	2589		Mieda et al., 1999
Maus Ten3 (ten-m3/odz-2/odz-3)	NM 011857	2715		Oohashi et al., 1999 (Ben-Zur und Wides, 1999 / Ben-Zur et al., 2000)
Mensch TEN3	-	-	Nur Fragment, keine EGF-ähnliche Domäne vorhanden	Minet und Chiquet-Ehrismann, 2000
Teneurin-4				
Zebrärfisch TEN4 (ten-m4)	AB026980	2824		Mieda et al., 1999
Maus TEN4 (odz-4/DOC4)	AF059485	2771	Nur partiell (C-terminal)	Oohashi et al., 1999 (Ben-Zur und Wides, 1999 / Ben-Zur et al., 2000)
Huhn Ten4	AJ293019	278	Nur Fragment, keine EGF-ähnliche Domäne vorhanden	Tucker et al., 2000
Mensch TEN4	-	-		Minet und Chiquet-Ehrismann, 2000
Teneurin				
Fruchtlfliege Ten ^a	X68794	782	Protein besitzt keine YD-Domäne	Baumgartner und Chiquet-Ehrismann, 1993
Fruchtlfliege Ten ^m	X73154	2515		Baumgartner et al., 1994 (Levine et al., 1994, 1997a und b)
Fadenwurm Ten1	U00046	2560	EGF-ähnliches Motiv 4 und 5, sind durch 62 AS getrennt	Wilson et al., 1994; Minet und Chiquet-Ehrismann 2000; Drabkowski et al., 20005

2.1.1.3.2 Die K10-7 Sequenz entspricht linear hintereinander liegenden Motive bekannter Teneurine und Tenascine

Zur Konstruktion der EGF-ähnlichen Domäne von K10-7 wurde ein Alignment mit den Proteinen der Tenascin und Teneurin Familie durchgeführt (Abb. 11). Für das Alignment wurden die Sequenzen aus Tabelle 2 und Tabelle 3 mit Ausnahme von TN-N aus Maus und den Varianten 1 und 2 von Ten2 aus Hühnchen benutzt (siehe auch 2.1.1.3.1). Für eine übersichtliche Darstellung wurde das Alignment in sechs Blöcke unterteilt. Jeder Block enthält ein vollständiges EGF-ähnliches Motiv von K10-7 und das entsprechenden Motiv der Tenascine und Teneurine. Alle Blöcke zusammen ergeben die vollständige Sequenz der EGF-ähnlichen Domäne von K10-7 (Abb. 11).

Aufgrund der variablen Motivanzahl der EGF-ähnlichen Domäne der Tenascine ist ein direkter Vergleich mit der Domäne von K10-7 nicht sinnvoll. Daher wurde die Sequenzidentität der einzelnen EGF-ähnlichen Motive innerhalb eines Blocks mit einander verglichen (Tabelle 4). Um die relative Lage eines EGF-ähnlichen Motivs innerhalb der EGF-ähnlichen Domäne wiederzugeben, wurden die einzelnen Motive beginnend mit dem ersten vollständigen Motiv innerhalb der Domäne durchgezählt. So bedeutet EGF(3) von TN-X das dritte vollständige EGF-ähnliche Motiv von TN-X.

Die EGF-ähnliche Domäne von K10-7 weist mit den ersten sechs EGF-ähnlichen Motiven der Teneurine eine Sequenzähnlichkeit zwischen 24,2% und 36,8% auf. Eine Ausnahme bilden Block 3 und Block 5, die eine sehr geringe Sequenzidentität mit K10-7 haben. In Block 3 besitzt das EGF-ähnliche Motiv eine Sequenzähnlichkeit von 8,1% bis 13,5% und in Block 5 von 10% bis 20,4%. Die höchste Übereinstimmung haben EGF(1) von K10-7 und EGF(1) von Ten4 aus *Danio*.

Die EGF-ähnliche Domäne der Tenascine TN-R, TN-W und TN-Y enthält weniger EGF-ähnliche Motive, als die EGF-ähnliche Domäne von K10-7. Das halbe Motive dieser Proteine weist Sequenzähnlichkeit mit EGF(1) von K10-7 in Block 1 auf. Aufgrund ihrer Unvollständigkeit, werden diese für die Sequenzidentität nicht berücksichtigt. Das einzige vollständige EGF-ähnliche Motiv von TN-Y hat in Block 4 Sequenzähnlichkeit mit EGF(4) von K10-7. EGF(1) von TN-W, TN-R und TN-C haben Sequenzähnlichkeit mit den EGF-ähnlichen Motiven in Block 2. Dann kommt es zu einem Schub der EGF-ähnlichen Motive von TN-R im Alignment. So aliniert EGF(2) von TN-C in Block 3 und EGF(2) von TN-W und TN-R in Block 4. Durch einen Einschub zweier EGF-ähnlicher Motive (EGF(3) und EGF(4)) aliniert EGF(5) von TN-C in Block 4. EGF(3) von TN-W und TN-R alinieren in Block 5 und EGF(4) von TN-R in Block 6. Die Proteine der TN-X Unterfamilie besitzen die größte EGF-ähnliche Domäne. Und so alinieren die EGF-ähnlichen Motive von K10-7 mit EGF(4) bis EGF(9) von TN-X. Vergleicht man die Sequenzähnlichkeit der EGF-ähnlichen Motive von

K10-7 mit denen der Tenascine, so findet man ähnliche Werte wie bei denen der Teneurine. Die höchste Sequenzähnlichkeit besitzt EGF(7) von TN-X aus Hühnchen mit EGF(6) von K10-7 (36.3%). Im Allgemeinen liegt die Sequenzähnlichkeit zwischen 18,7% bis 34,3%. Wie schon bei den Teneurine besitzen die EGF-ähnlichen Motive von K10-7 in Block 3 und Block 5 nur geringe Sequenzähnlichkeiten.

Tabelle 4: Sequenzidentität der EGF-ähnlichen Motive von K10-7 mit denen der Tenascine und Teneurine. Die höchsten Sequenzidentitäten eines Blocks wurden dunkel, die niedrigsten wurden hellgrau unterlegt. Die Abkürzungen lauten wie folgt: bo, Bos taurus; ce, Caenorhabditis elegans; da, Danio rerio; dr, Drosophila melanogaster; Ga, Gallus gallus; Ho, Homo sapiens; mu, Mus musculus; ra, Rattus norvegicus; su, Sus scrofa.

Sequenzidentität der EGF-ähnlichen Motive von K10-7 mit den der Ten und TN												
	Block 1		Block 2		Block 3		Block 4		Block 5		Block 6	
K10-7	EGF(1)	%	EGF(2)	%	EGF(3)	%	EGF(4)	%	EGF(5)	%	EGF(6)	%
Tena dr	EGF(1)	26,4	EGF(2)	25,0	EGF(3)	13,5	EGF(4)	31,5	EGF(5)	15,9	EGF(6)	30,3
Tenm dr	EGF(1)	32,3	EGF(2)	28,1	EGF(3)	8,1	EGF(4)	28,9	EGF(5)	13,6	EGF(6)	24,2
Ten1 ce	EGF(1)	28,5	EGF(2)	25,0	EGF(3)	10,5	EGF(4)	36,8	EGF(5)	10,0	EGF(6)	34,3
TEN1 ga	EGF(1)	38,2	EGF(2)	31,2	EGF(3)	8,1	EGF(4)	31,5	EGF(5)	20,4	EGF(6)	30,3
Ten1 mu	EGF(1)	32,4	EGF(2)	31,2	EGF(3)	8,1	EGF(4)	34,2	EGF(5)	20,4	EGF(6)	30,3
TEN1 ho	EGF(1)	38,2	EGF(2)	31,2	EGF(3)	8,1	EGF(4)	31,5	EGF(5)	20,4	EGF(6)	30,3
TEN2 ga	EGF(1)	38,2	EGF(2)	34,3	EGF(3)	8,1	EGF(4)	34,2	EGF(5)	15,9	EGF(6)	33,3
Ten2 mu	EGF(1)	35,1	EGF(2)	28,1	EGF(3)	8,1	EGF(4)	36,8	EGF(5)	15,9	EGF(6)	33,3
Ten2 ra	EGF(1)	37,2	EGF(2)	28,1	EGF(3)	8,1	EGF(4)	36,8	EGF(5)	13,6	EGF(6)	33,3
TEN3 da	EGF(1)	35,1	EGF(2)	31,2	EGF(3)	8,1	EGF(4)	31,5	EGF(5)	13,6	EGF(6)	33,3
Ten3 mu	EGF(1)	34,1	EGF(2)	31,2	EGF(3)	10,8	EGF(4)	28,9	EGF(5)	15,9	EGF(6)	36,3
TEN4 da	EGF(1)	40,0	EGF(2)	28,1	EGF(3)	8,1	EGF(4)	31,5	EGF(5)	11,3	EGF(6)	30,3
Ten4 mu	EGF(1)	35,1	EGF(2)	31,2	EGF(3)	8,1	EGF(4)	36,8	EGF(5)	13,6	EGF(6)	27,2
TN-Y ga	EGF(½)	15,1	-	-	-	-	EGF(1)	26,3	EGF(½)	7,3	-	-
TN-W da	EGF(½)	18,1	EGF(1)	34,3	-	-	EGF(2)	31,5	EGF(3)	11,6	-	-
TN-W mu	EGF(½)	15,1	EGF(1)	18,7	-	-	EGF(2)	28,9	EGF(3)	11,6	-	-
TN-R da	EGF(½)	15,1	EGF(1)	21,8	-	-	EGF(2)	26,3	EGF(3)	16,2	EGF(4)	30,3
TN-R mu	EGF(½)	15,1	EGF(1)	18,7	-	-	EGF(2)	31,5	EGF(3)	13,9	EGF(4)	30,3
TN-R ra	EGF(½)	18,1	EGF(1)	18,7	-	-	EGF(2)	31,5	EGF(3)	13,9	EGF(4)	30,3
TN-R ho	EGF(½)	18,1	EGF(1)	18,7	-	-	EGF(2)	31,5	EGF(3)	13,9	EGF(4)	30,3
TN-C ga	EGF(½)	18,1	EGF(1)	31,2	EGF(2)	13,5	EGF(5)	31,5	EGF(6)	16,2	EGF(7)	36,3
TN-C mu	EGF(½)	18,1	EGF(1)	25,0	EGF(2)	10,8	EGF(5)	31,5	EGF(6)	13,9	EGF(7)	27,2
TN-C su	EGF(½)	18,1	EGF(1)	28,1	EGF(2)	10,8	EGF(5)	31,5	EGF(6)	13,9	EGF(7)	33,3
TN-C ho	EGF(½)	18,1	EGF(1)	25,0	EGF(2)	10,8	EGF(5)	31,5	EGF(6)	13,9	EGF(7)	33,3
TN-X mu	EGF(4)	29,4	EGF(5)	21,8	EGF(6)	10,8	EGF(7)	31,5	EGF(8)	16,2	EGF(9)	27,2
TN-X bo	EGF(4)	29,4	EGF(5)	25,0	EGF(6)	10,8	EGF(7)	31,5	EGF(8)	16,2	EGF(9)	27,2
TN-X ho	EGF(4)	29,4	EGF(5)	25,0	EGF(6)	13,5	EGF(7)	31,5	EGF(8)	16,2	EGF(9)	27,2

Nächste Seiten

Abb. 11: Alignment der EGF-ähnlichen Motive von K10-7 mit den Tenascinen und Teneurinen. Das Alignment wurde in sechs Blöcke unterteilt, von denen jeder ein vollständiges EGF-ähnliche Motiv trägt. Die Sequenzübereinstimmungen von K10-7 mit den Tenascin- und Teneurin-Sequenzen sind grau unterlegt. Die Abkürzungen lauten wie folgt: bo, Bos taurus; ce, Caenorhabditis elegans; da, Danio rerio; dr, Drosophila melanogaster; Ga, Gallus gallus; Ho, Homo sapiens; mu, Mus musculus; ra, Rattus norvegicus; su, Sus scrofa.

[illegible]

Block 4			Block 5			Block 6		
K10-7	100	ATDSFSSSTCNPAVCESNQKGVNGVQCKKWSGNA	----	VYQNDHYNTDGVLFKCDKCPYLPGI--EN--PSCKPASLPSPC	----	-----NSK--CVLNDGKCNKTEKGLCEGWTGNA	207	
Tena dr	544	----DQHDCLDPLC-S-SHGTCVAGQCYCKAGWGEDC	----	-----GTIDQQVQCLPGSEHGTLDLETGQVCYCEHWTPDC	----	SQAVCLDCGRN-GVCE--GKRCNSGWTGILC	645	
Tenn dr	392	----EEVDCPHNC-S-SHGFCADGTCTCKKWKGPDC	----	-----ATMDQALQCLPCSGHGTFTDLDTQTCCEAKWSGDDC	----	SEKELCDLDCGSH-GREGE--DACADPEWGGYTC	492	
Ten1 ce	408	----ELRACPHASC-HDRGVCTGTCVMDGRGNDC	47 AS	ELQKPIATVQVPTSESSHPCSAHG--QLIDDDICQESGWDVDC	----	SQAACQ--CVN--GDCILDD-GSQCKWKGRGNSC	569	
TEN1 ga	605	----EEEDCLDPMC-S-SHGVCVQGECHCSAGWGVNC	----	-----ETS--LPIQCEHCSGHGTFLDVLGVCSEPOWTGSDC	----	STELCTLDGSH-GVCSR--GTCQCEGWTGPTC	703	
TEN1 ga	623	----EEEDCLDPMC-S-SHGICVKGECHCSTGWGVNC	----	-----ETP--LPIQCEQCSGHGTFLDVLGVCSDPFWTGSDC	----	STELCTMEGSH-GVCSR--GTCQCEGWTGPTC	721	
TEN1 ho	624	----EEEDCLDPMC-S-SHGICVKGECHCSTGWGVNC	----	-----ETP--LPIQCEQCSGHGTFLDVLGVCSDPFWTGSDC	----	STELCTMEGSH-GVCSR--GTCQCEGWTGPTC	722	
TEN2 ga	668	----EEVDCLDPTC-S-SHGVCVNGECLCSPGWGGINC	----	-----ELP--RAQCPDQCSGHGTFLDVLGVCSDPFWMGPD	----	SVEVCSVDCGTH-GVCIG--GACRCEEGWTGVAC	766	
TEN2 mu	668	----EEVDCLDPTC-S-SHGVCVNGECLCSPGWGGINC	----	-----ELA--RVQCPDQCSGHGTFLDVLGVCSDPFWMGPD	----	SV--VCSVDCGTH-GVCIG--GACRCEEGWTGAAC	765	
TEN2 ra	668	----EEVDCLDPTC-S-SHGVCVNGECLCSPGWGGINC	----	-----ELA--RVQCPDQCSGHGTFLDVLGVCSDPFWMGPD	----	SVEVCSVDCGTH-GVCIG--GACRCEEGWTGAAC	766	
TEN3 da	500	----EEVDCLDPTC-S-SHGVCVNGECLCSPGWGGINC	----	-----EIL--KTMCADQCSGHGTFLDVLGVCSDPFWMGPD	----	STIEVCAYDCGSH-GVCIG--GSCRCEEGWTGVC	598	
TEN3 mu	610	----EEADCLDPGC-S-SHGVCVNGECLCSPGWGGINC	----	-----EIL--KTMCADQCSGHGTFLDVLGVCSDPFWMGPD	----	SNEICSVDCGSH-GVCMG--GSCRCEEGWTGPAC	708	
TEN4 da	729	----EEVDCLDPTC-S-SHGVCVNGECLCSPGWGGINC	----	-----ESP--RASCMQCSGHGTFLDVLGVCSDPFWMGPD	----	STELCAADCGSH-GICVA--GSCRCEEGWTGPAC	827	
TEN4 mu	660	----EEVDCLDPTC-S-SHGVCVNGECLCSPGWGGINC	----	-----ETP--RATCLDQCSGHGTFLDVLGVCSDPFWMGPD	----	STELCAADCGSH-GICVA--GSCRCEEGWTGPAC	827	
TN-Y ga	104	----PAPRCP-LDC-S-DGRCRAGRCHCFEGTGPFC	----	-----ATP--RATCLDQCSGHGTFLDVLGVCSDPFWMGPD	----	STELCAADCGSH-GICVA--GSCRCEEGWTGPAC	758	
TN-W da	190	----SOLTCPN-DCK--DKGHCVDKCVCFSGFSGEDC	----	-----SIA--TCPNDICGNRC--VDGRCICDEGFFGIDC	----	STELCAADCGSH-GICVA--GSCRCEEGWTGPAC	148	
TN-W mu	198	----AYACPQ-DC-S-SHGVCVQGVQCHEDTAEAC	----	-----SEQ--RCPGDCSGNFC--DTGECYCEMGTGPDC	----	-----	251	
TN-R da	225	----SEPRCP-DC-S-SRGLCVDGECVCEEPYTGEDC	----	-----SLG--RCLNDCSDQAC--VNGSCQCSGFLGEDC	----	SLIFCANNCSQR-GVCKE--GFCVCQEGYTGDDC	259	
TN-R mu	219	----SELRCP-DC-S-SRGLCVDGECVCEEPYTGEDC	----	-----REL--RCPGDCSGKQC--ANGTCLCQEGYAGEDC	----	SQRRCLNACSGR-GHQE--GLCICEGYQGPDC	310	
TN-R ra	231	----SELRCP-DC-S-SRGLCVDGECVCEEPYTGEDC	----	-----REL--RCPGDCSGKQC--ANGTCLCQEGYAGEDC	----	SQRRCLNACSGR-GHQE--GLCICEGYQGPDC	323	
TN-R ho	230	----SELRCP-DC-S-SRGLCVDGECVCEEPYTGEDC	----	-----REL--RCPGDCSGKQC--ANGTCLCQEGYAGEDC	----	GQRQCLNACSGR-GQCE--GLCICEGYQGPDC	321	
TN-C ga	221	----GELICPN-DCF--DRGRCINGTCVCEEGYTGEDC	----	-----GEL--TCPNNGNRC--ENGLCVCHGEFVGDDC	----	SQKRCPCDNNR-GHCV--GRCVCHGYLGEDC	320	
TN-C mu	321	----GELICPN-DCF--DRGRCINGTCVCEEGYTGEDC	----	-----GEL--TCPNNGNRC--ENGLCVCHGEFVGDDC	----	SEKRCPCDNNR-GHCV--GRCVCHGYLGEDC	410	
TN-C su	332	----GELICPN-DCF--DRGRCINGTCVCEEGYTGEDC	----	-----GRL--ACPHGCRGRRC--EEGQCVCEDEGAGADC	----	SERRCPDCHNR-GRCIL--GRCEDDGFEGEDC	421	
TN-C ho	308	----GELICPN-DCF--DRGRCINGTCVCEEGYTGEDC	----	-----GKP--TCPHACTQGRRC--EEGQCVCEDEGAGADC	----	SEKRCPCDCHNR-GRCIL--GRCEDDGFEGEDC	407	
TN-X mu	355	----STRTCP-RDOR--GRGRCEDGECIDAGYSGDDC	----	-----GVR--SCPGDCNQRGRC--EDGRVCVWPYGTGADC	----	TTRACPRDCRGR-GRCED--GVCVCHAGYSGEDC	448	
TN-X bo	368	----STRTCP-RDOR--GRGRCEDGECIDAGYSGDDC	----	-----GVR--SCPGDCNQRGRC--EDGRVCVWPYGTGADC	----	GARACPRDCRGR-GRCEN--GVCVCHAGYSGEDC	460	
TN-X ho	368	----STRTCP-RDOR--GRGRCEDGECIDAGYSGDDC	----	-----GVR--SCPGDCNQRGRC--EDGRVCVWPYGTGADC	----	GSRACPRDCRGR-GRCEN--GVCVCHAGYSGEDC	460	
Konsensus			C C G G C C G G C C G G C C G G C C			C C G G C C G G C C G G C C		

2.1.1.4 Abgeleitete Faltstruktur der EGF-ähnlichen Domäne von K10-7

Untersuchungen an kleinen Molekülen (weniger als 100 AS) zeigten, dass die Eliminierung einer Disulfidbrücke durch die Entfernung eines Cysteins zur Konformationsänderung in räumlicher Nähe der Brücke führt, die native Struktur jedoch meist erhalten bleibt (van Mierlo et al., 1991; Le-Nguyen et al., 1993). Bei dem EGF aus der Maus hat die Eliminierung von Disulfidbrücken, durch den Austausch eines Cysteins durch α -amino-Buttersäure (Abu) dem isosterischen Analog des Cysteins, unterschiedliche Auswirkungen auf die Konformation des Moleküls. Wird die erste Disulfidbrücke (Cys-1/Cys-3) eliminiert, so hat dies eine geringe Auswirkung auf die Tertiärstruktur des Moleküls, einzig der Bereich um die nicht vorhandene Brücke ist betroffen (Barnham et al., 1998). Die Aktivität des Moleküls bleibt weitgehend erhalten. Die Eliminierung der zweiten (Cys-2/Cys-4) oder dritten (Cys-5/Cys-6) Disulfidbrücke hingegen führt zu einer nahezu Linearisierung des Proteins und zu einer starken Abnahme der Aktivität (Alewood et al., 2005).

Basierend auf den bekannten EGF-Faltungsdaten wurde eine mögliche Tertiärstruktur für jedes EGF-ähnliche Motiv von K10-7 ermittelt. Hierzu wurden konservierte Cysteine und Glycine berücksichtigt. Die Position der konservierten Cysteine wurde mittels des Alignments aus 2.1.1.3.2 bestimmt (Abb. 11). Nach der Zuordnung der Cysteine im EGF-ähnlichen Motive, wurden mögliche Partner zur Bildung einer Disulfidbrücke bestimmt. Zur Unterstützung der Positionsfindung und der daraus resultierenden Schleifenbildung, wurde auch die Position von konservierten Glycinen berücksichtigt (Abb. 10).

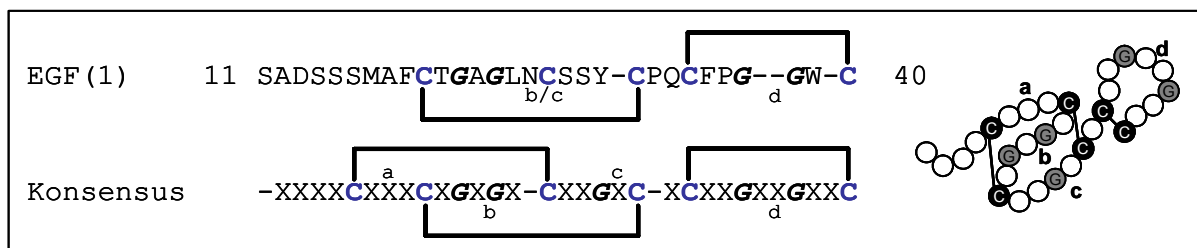


Abb. 12: Erstes EGF-ähnliches Motiv von K10-7. Sequenz des ersten EGF-ähnlichen Motivs EGF(1) von K10-7 mit der Konsensussequenz aus dem Alignment (Abb. 11). Konservierte Cysteine sind blau, konservierte Glycine fett markiert. Mögliche Disulfidbrücken sind eingezeichnet und die dadurch gebildete Schleife benannt. Zur Übersicht ist ein vollständiges EGF-ähnliches Motiv schematisch dargestellt.

Das EGF-ähnliche Motive EGF(1) von K10-7 besteht aus 31 Aminosäuren und enthält alle faltungsrelevanten Cysteine bis auf Cys-1 (Abb. 12). Daher könnten durch Disulfidbrückenbildung der Cysteinpaare Cys-2/Cys-4 und Cys-5/Cys-6 die Schleifen b, c und d ausgebildet sein. Durch das Fehlen von Cys-1 kann Schleife a nicht ausgebildet werden. Schleife b enthält die beiden konservierten Glycine Gly-1 und Gly-2. Schleife d wird gebildet ist aber verkürzt. Sie trägt die Glycine Gly-4 und Gly-5. Diese werden aber nicht wie in allen EGF-ähnlichen Motiven der Tenascine und Teneurine durch zwei Aminosäuren

getrennt. Auffällig ist der Abstand zwischen Cys-4 und Cys-5. Dieser ist hoch konserviert und enthält immer nur eine einzige Aminosäure. Im EGF-ähnlichen Motiv EGF(1) von K10-7 werden die Cysteine durch zwei Aminosäuren getrennt.

Aufgrund der Ausbildung der zweiten und dritten Disulfidbrücke ist anzunehmen, dass EGF(1) eine EGF-ähnliche Konformation annimmt.

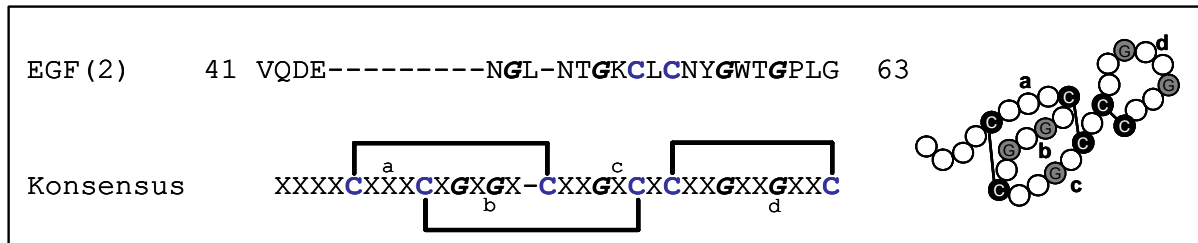


Abb. 13: Zweites EGF-ähnliches Motiv von K10-7. Sequenz des zweiten EGF-ähnlichen Motivs EGF(2) von K10-7 mit der Konsensussequenz aus dem Alignment (Abb. 11). Konservierte Cysteine sind blau, konservierte Glycine fett markiert. Mögliche Disulfidbrücken sind eingezeichnet und die dadurch gebildete Schleife benannt. Zur Übersicht ist ein vollständiges EGF-ähnliches Motiv schematisch dargestellt.

Das EGF-ähnliche Motiv EGF(2) ist mit nur 23 Aminosäuren stark verkürzt (Abb. 13). Eindeutig zuzuordnen ist jedoch nur das C-terminale Ende von EGF(2). Konserviert sind die Glycine Gly-3, Gly-4 und Gly-5 und die Cysteine Cys-4 und Cys-5. Aufgrund der fehlenden Cysteine können keine Disulfidbrücken ausgebildet werden. Dennoch wird vermutet, dass EGF(2) ein EGF-ähnliches Motiv ist. Die beiden Cysteine Cys-4 und Cys-5 sind in der Ausbildung der Schleifen c und d involviert. In EGF(2) ist ihre Position sowie der Abstand zu einander, getrennt durch eine einzige Aminosäure, konserviert. In richtiger räumlicher Nähe zu Cystein Cys-4 befindet sich auch das Glycin Gly-3, getrennt durch nur eine Aminosäure. Das Cystein Cys-5 bildet normalerweise zusammen mit Cys-6 die Schleife d. Im EGF-ähnlichen Motiv EGF(2) ist Cys-6 jedoch durch ein Glycin substituiert, so dass keine Disulfidbrücke ausgebildet werden kann. Wenn auch die Schleife d nicht gebildet werden kann, so ist doch eindeutig dessen Struktur zu erkennen. Die acht Aminosäuren, die zur Bildung der Schleife d nötig sind, sind vorhanden, ebenso sind die Glycine Gly-4 und Gly-5 konserviert. Im Alignment aliniert EGF(2) mit EGF(2) der Teneurine (Abb. 10). Bei allen Teneurinen ist in EGF(2) das Cystein Cys-3 durch ein Tyrosin ersetzt. Eine ähnliche Substitution in EGF(2) von K10-7 ist aber nicht nachweisbar.

Da EGF(2) ein relativ kurzes EGF-ähnliches Motiv (23 AS) ist und offensichtlich keine der konservierten Disulfidbrücken ausbildet, ist es unwahrscheinlich, dass EGF(2) eine EGF-ähnliche Konformation annimmt.

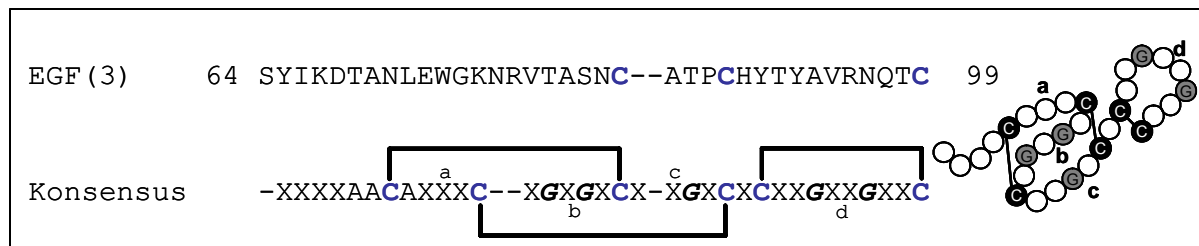


Abb. 14: Drittes EGF-ähnliches Motiv von K10-7. Sequenz des dritten EGF-ähnlichen Motivs EGF(3) von K10-7 mit der Konsensussequenz aus dem Alignment (Abb. 11). Konservierte Cysteine sind blau, konservierte Glycine fett markiert. Mögliche Disulfidbrücken sind eingezeichnet und die dadurch gebildete Schleife benannt. Zur Übersicht ist ein vollständiges EGF-ähnliches Motiv schematisch dargestellt.

Das EGF-ähnliche Motiv EGF(3) weist im Sequenzvergleich die geringste Übereinstimmung mit EGF-ähnlichen Motiven der Tenascine und Teneurine auf (Abb. 14). Es ist 36 Aminosäuren lang und besitzt die konservierten Cysteine Cys-3, Cys-4 und Cys-6. Glycine sind nicht konserviert. Aufgrund der fehlenden Bindungspartner können keine Disulfidbrücken ausgebildet werden.

Es ist offensichtlich, dass EGF(3) keine EGF-ähnliche Konformation einnimmt.



Abb. 15: Viertes EGF-ähnliches Motiv von K10-7. Sequenz des vierten EGF-ähnlichen Motivs EGF(4) von K10-7 mit der Konsensussequenz aus dem Alignment (Abb. 11). Konservierte Cysteine sind blau, konservierte Glycine fett markiert. Mögliche Disulfidbrücken sind eingezeichnet und die dadurch gebildete Schleife benannt. Zur Übersicht ist ein vollständiges EGF-ähnliches Motiv schematisch dargestellt.

Das EGF-ähnliche Motiv EGF(4) enthält 38 Aminosäuren (Abb. 15). Von den faltungsrelevanten Cysteinen sind alle bis auf Cys-6 vorhanden. Bei den konservierten Glycinen fehlt Gly-1. Durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinpaaren Cys-1/Cys-3 und Cys-2/Cys-4 werden die Schleifen a, b und c ausgebildet. Die Schleife a der EGF(4) von K10-7 besitzt wie die der EGF(4) der Teneurine vier Aminosäuren. Schleife b ist größer. Normalerweise beinhaltet sie fünf Aminosäuren, bei K10-7 sind es aber zwei mehr. Sie enthält auch nur eines der beiden konservierten Glycine, Gly-2. Schleife c ist normal ausgebildet und besitzt das konservierte Glycin Gly-3. Zur Ausbildung der Schleife d kann es nicht kommen, da EGF(4) das Cys-6 fehlt. Es ist durch ein Alanin substituiert. Auch wenn Schleife d nicht gebildet werden kann, so besitzt sie trotzdem die konservierten Glycine Gly-4 und Gly-5. Eine weitere Besonderheit dieser Schleife ist ein zusätzliches

Cystein, das direkt auf Cys-5 folgt, aber keine für EGF-ähnliche Motive spezifische Disulfidbrücke ausbilden kann.

Das EGF-ähnliche Motiv EGF(4) von K10-7 kann zwei der drei Disulfidbrücken ausbilden. Es erscheint fraglich, ob eine EGF-ähnliche Struktur zu stand kommt, da die dritte und essentielle Disulfidbrücke (Cys-5/Cys-6) fehlt.

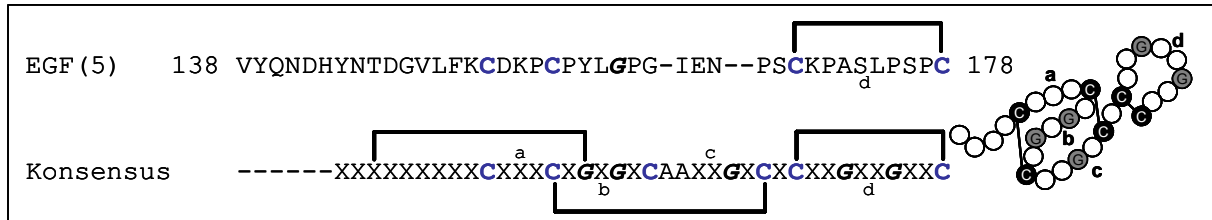


Abb. 16: Fünftes EGF-ähnliches Motiv von K10-7. Sequenz des fünften EGF-ähnlichen Motivs EGF(5) von K10-7 mit der Konsensussequenz aus dem Alignment (Abb. 11). Konservierte Cysteine sind blau, konservierte Glycine fett markiert. Mögliche Disulfidbrücken sind eingezeichnet und die dadurch gebildete Schleife benannt. Zur Übersicht ist ein vollständiges EGF-ähnliches Motiv schematisch dargestellt.

Das EGF-ähnliche Motiv EGF(5) ist mit 41 Aminosäuren das größte Motiv der EGF-ähnlichen Domäne von K10-7 (Abb. 16). Konserviert sind die Cysteine Cys-1, Cys-2, Cys-5 und Cys-6 und das Glycerin Gly-2. Zur Ausbildung einer Disulfidbrücken kann es nur zwischen Cys-5 und Cys-6 kommen. Es wird die Schleife d gebildet. Diese enthält aber keine konservierten Glycine. Im Alignment aliniert EGF(5) von K10-7 mit EGF(5) der Teneurine (Block 5 in Abb. 10). Diesem EGF-ähnlichen Motiv fehlt das Cystein Cys-3, welches durch Tyrosin oder Phenylalanin substituiert ist.

EGF(5) bildet nur die dritte (Cys-5/Cys-6) Disulfidbrücke aus. Dies ist zu wenig um eine EGF-ähnliche Tertiärstruktur einzunehmen.

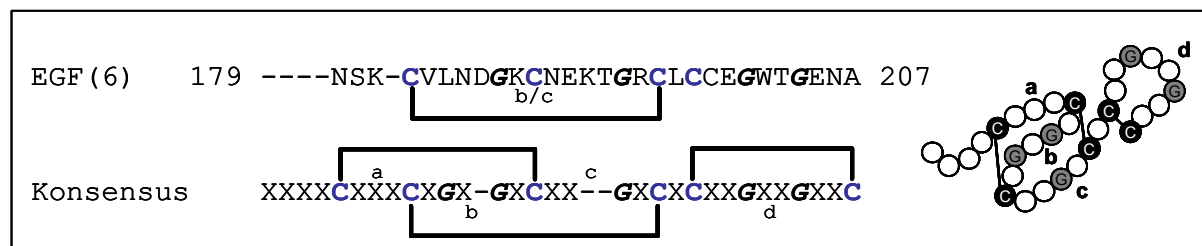


Abb. 17: Sechstes EGF-ähnliches Motiv von K10-7. Sequenz des sechsten EGF-ähnlichen Motivs EGF(6) von K10-7 mit der Konsensussequenz aus dem Alignment (Abb. 11). Konservierte Cysteine sind blau, konservierte Glycine fett markiert. Mögliche Disulfidbrücken sind eingezeichnet und die dadurch gebildete Schleife benannt. Zur Übersicht ist ein vollständiges EGF-ähnliches Motiv schematisch dargestellt.

Das EGF-ähnliche Motiv EGF(6) von K10-7 besteht aus 29 Aminosäuren und enthält die konservierten Cysteine Cys-2, Cys-3, Cys-4 und Cys-5, sowie die Glycine Gly-2, Gly-3, Gly-4 und Gly-5 (Abb. 17). Ausgebildet wird nur die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinpaar Cys-2/Cys-4. Da Cys-1 fehlt, kann Cys-3 keine Disulfidbrücke eingehen, und so kommt es zu

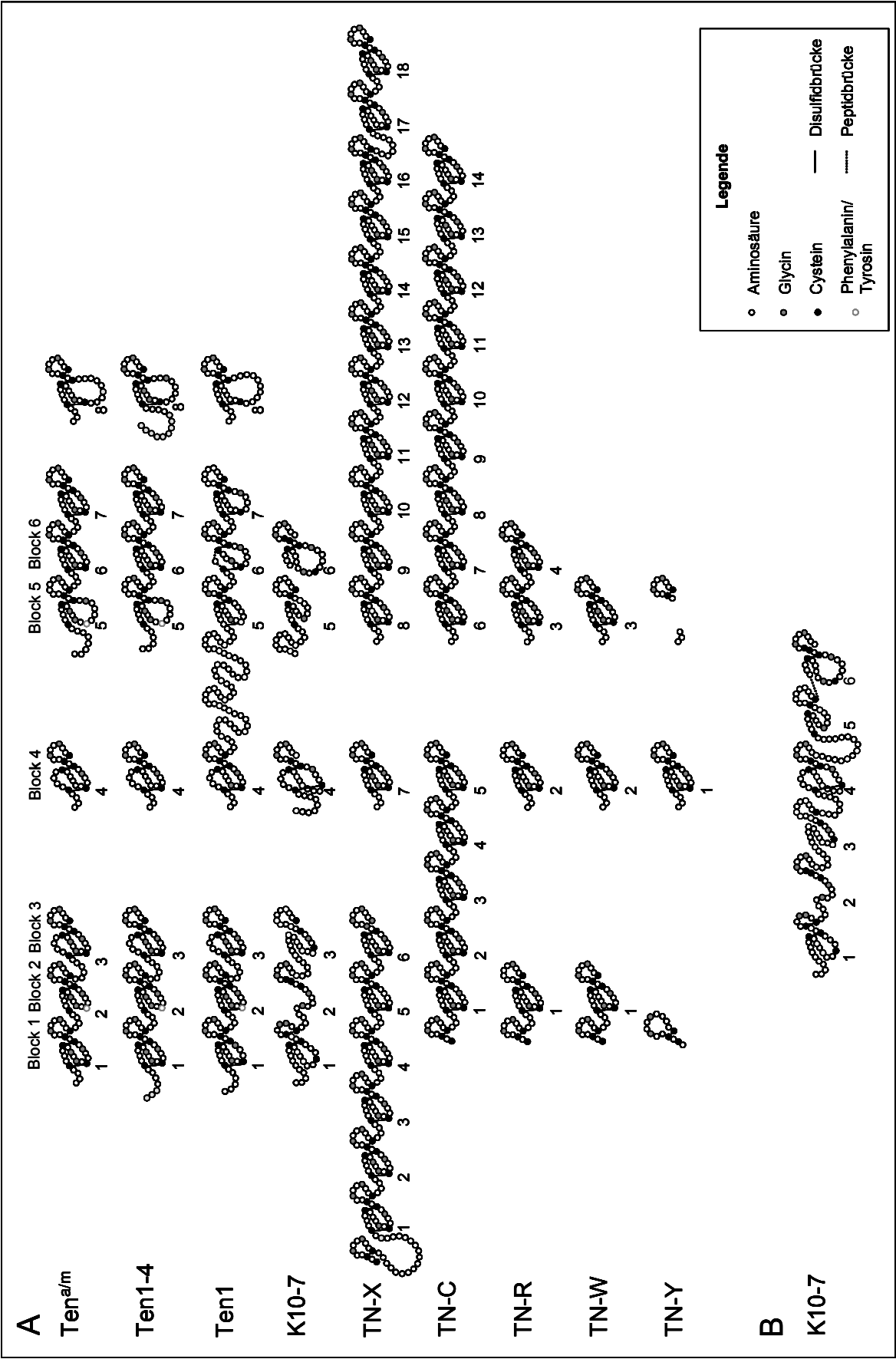
einer Verschmelzung der Schleifen b und c. In dieser Schleife sind die Glycine Gly-2 und Gly-3 konserviert. Auch Schleife d kann nicht gebildet werden. Der Bindungspartner von Cys-5, Cys-6 fehlt. Er wurde durch ein Alanin substituiert. Die konservierten Glycine, Gly-4 und Gly-5 sind allerdings in EGF(6) vorhanden.

Dem EGF(6) Motiv fehlen beide Disulfidbrücke die für die Ausbildung einer EGF-ähnlichen Tertiärstruktur nötig sind. Die Ausbildung der ersten (Cys-1/Cys-3) Disulfidbrücke reicht nicht aus.

Basierend auf den Erkenntnissen der Einzeluntersuchungen der möglichen EGF-ähnlichen Motive von K10-7 wurde versuchsweise die gesamte EGF-ähnliche Domäne konstruiert (Abb. 18). Dazu wurden die Aminosäuren der einzelnen Motive entsprechend ihrer Position im Alignment zugeordnet. Für die Konstruktion der einzelnen Schleifen wurden dann diese Positionen so wenig wie möglich verändert.

Nächste Seite

Abb. 18: Schematische Darstellung des Alignment der EGF-ähnlichen Domänen von K10-7 und der Proteine der Tenascine und der Teneurine. (A) Alignment der EGF-ähnlichen Domänen der Tenascin und Teneurin Proteine mit K10-7. (B) Mögliche Faltung der EGF-ähnlichen Domäne von K10-7.



2.1.1.5 Die Expression von *K10-7*

Die Expression von *K10-7* wurde während verschiedener Fußbildungsprozesse mittels Ganztier *in situ* Hybridisierung untersucht. In morphogenetisch aktiven Tieren wurde sowohl die Fußbildung während der Regeneration, als auch während der Knospung untersucht. Zusätzlich wurde die Expression in LiCl inkubierten Tieren untersucht, also während der ektopischen Fußbildung. Um eine mögliche Koexpression von *K10-7* mit einem Rezeptor für einen Fibroblasten-Wachstumsfaktor nachzuweisen, wurde eine Doppelmarkierung mit verschiedenen Knospungsstadien durchgeführt.

2.1.1.5.1 Die Expression von *K10-7* in morphogenetisch aktiven Tieren

K10-7 wird im intakten Fuß von *Hydra* in ausdifferenzierten Ektodermzellen der Basalscheibe exprimiert (Abb. 19A). Die Expression erstreckt sich von der Basalscheibe bis zum apikalen Rand des Fußes. Kontrollversuche mit Digoxigenin-markierten *sense*-RNA Sonde führten zu keiner Färbung (Abb. 19B).

Zur Untersuchung der Expression von *K10-7* während der Fußregeneration, wurde der Fuß mittels eines geraden Schnittes im unteren Fünftel des Polypen entfernt (Abb. 19C). In den ersten 17 Stunden der Fußregeneration ist keine Expression von *K10-7* nachweisbar (Abb. 19D und G). Während der Wundheilung nähern sich die Enden der Schnittstelle an. Palisadenförmige entodermale Zellen verschließen die Wunde. Auf dieser Zellschicht werden dünne ektodermale Zellen gebildet (Hoffmeister und Schaller, 1985). Nach 18 Stunden startet die *K10-7* Expression in der Region, aus der sich die Fußscheibe bilden wird (Abb. 19E und H). Die zuvor abgeflachten ektodermalen Zellen am basalen Ende sind nun säulenförmig. Die morphologische Veränderung erfolgt kurz bevor epitheliale Zellen zu Sekret bildenden Zellen differenzieren. Nach 36 Stunden ist die Regeneration des Fußes abgeschlossen (Abb. 19F und I). Die Expression von *K10-7* erstreckt sich nun wieder über von der Basalscheibe bis zum apikalen Rand des Fußes.

Bei der Fußbildung während der Knospung startet die Expression von *K10-7* im Campbell Stadium 7 (Abb. 19L und M) am basalen Ende der Knospe auf der Unterseite. Die Knospe ist dann etwa um die 35 Stunden alt. Zu diesem Zeitpunkt bilden sich neue Tentakelstummel, schon vorhandene verlängern sich. Zu einem früheren Zeitpunkt ist keine Expression nachweisbar (Abb. 19J und K). In Stadium 8 differenziert das Fußgewebe. Die Expression folgt der Differenzierung des Fußgewebes und umschließt letztendlich das gesamte basale Ende der Knospe (Abb. 19N und O).

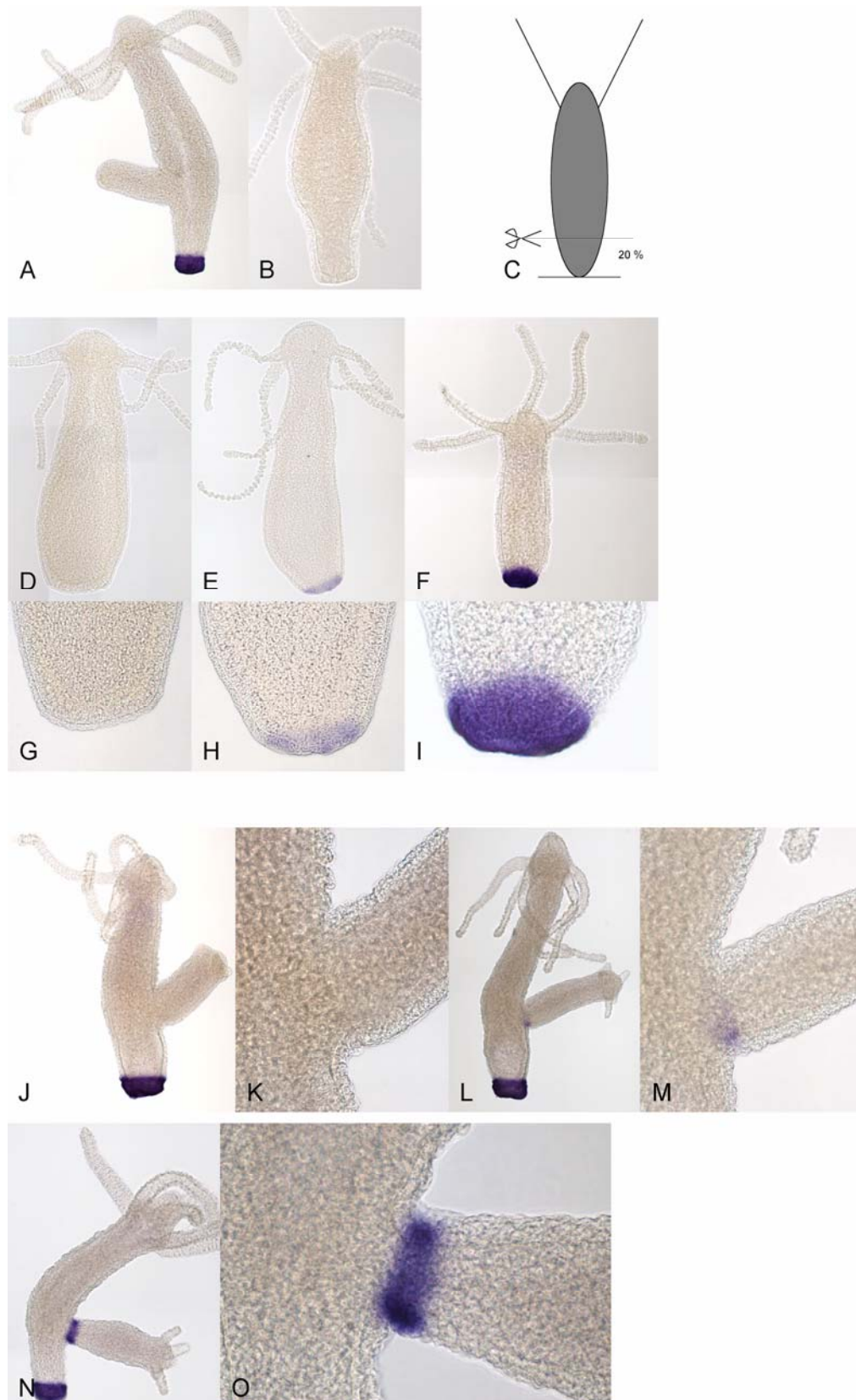


Abb. 19: Expressionsmuster von *K10-7* während Knospung und Fußregeneration. (A) Expression von *K10-7* im adulten Polypen; (B) Negativkontrolle einer *K10-7* sense-RNA Sonde. (C) schematische Abbildung der Schnittebene für Fußregenerationsversuche. (D - I) Fußregeneration, oben jeweils die Übersicht, unten Detail: nach 17 h (D, G); nach 18 h (E, H); nach 36 h (F, I). (J - O) Knospung, links die Übersicht, rechts die Detailaufnahme: Knospenstadium 6 (J, K); Knospenstadium 7 (L, M); Knospenstadium 8 (N, O).

2.1.1.5.2 Die flecken- und ringförmige Expression von *K10-7* bei ektopischer Fußbildung

Die Inkubation in 1 mM LiCl von *Hydra vulgaris* über mehrere Tage führt zu einer ektopischen Fußbildung entlang der gesamten Körperachse (Hassel und Berking, 1990). Um die Expression von *K10-7* während der ektopischen Fußbildung nachzuweisen, wurden knospenlose Hydren fünf Tage lang in 1 mM LiCl inkubiert und anschließend eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt.

Im Gegensatz zu unbehandelten Tieren beschränkt sich das Expressionsmuster von *K10-7* nicht mehr nur auf die Fußregion, sondern tritt in Flecken, Ringen oder Kreisen über den Körper verteilt auf (Abb. 20A und B). Alle Expressionsstellen werden zum Rand und zum Zentrum hin schwächer, was bis zu einem expressionsfreien Zentrum des Rings führen kann. Die Kopfregion bleibt immer frei von Expression. Das Expressionsmuster im Fuß zieht sich jetzt bandförmig um den oberen Teil des Fußes, wobei die Fußscheibe selbst kein *K10-7* exprimiert.

Durch die 1 mM LiCl Behandlung wird die Knospung unterdrückt (Hassel und Berking, 1990). Um ausschließen zu können, dass die ektopische und lokalisierte Expression von *K10-7* auf ein autarkes „Weiterlaufen“ des Fußbildungsprogramms einer ansonsten unterdrückten Knospe zurückzuführen ist, wurde die *K10-7* Expression in Jungpolypen analysiert. Jungpolypen sind frisch abgelöste Knospen, die noch nicht zur Knospung fähig sind. Am vierten Tag nach der Ablösung erfolgte die Inkubation in 1 mM LiCl eine Stunde nach Fütterung und wurde fünf Tage lang durchgeführt. Das Expressionsmuster der LiCl behandelten Jungtiere ähnelt dem der Adulti (Abb. 20C und D). Die Expression wurde lokal in Ringen und Flecken entlang der Körperachse nachgewiesen. Die Ränder der einzelnen Expressionsstellen sind noch weniger deutlich begrenzt als bei den adulten Polypen. Das expressionsfreie Zentrum ist weniger stark ausgeprägt. Die Kopfregion ist wie bei unbehandelten Tieren frei von Expression. Im Fuß ist die Expression wie bei LiCl behandelten bandförmig. Die Fußscheibe ist immer frei von Expression.

Das ähnliche Expressionsmuster von *K10-7* bei mit LiCl behandelten Jungpolypen und adulten Tieren, lässt die Vermutung zu, dass die Expression auf eine ektopische Fußbildung zurückzuführen ist und nicht auf das Fortschreiten eines selbständig ablaufenden Fußbildungsprozesses während einer unterdrückten Knospung.

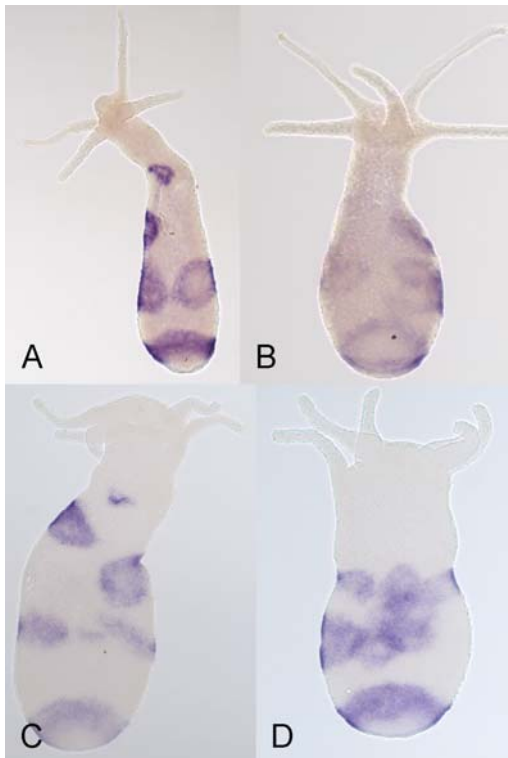


Abb. 20: Nachweis der *K10-7* Expression bei ectopischer Fußbildung in 1 mM LiCl. Knospenlose Hydren werden acht Tage in 1 mM LiCl inkubiert und dann mittels Ganztier *in situ* Hybridisierung untersucht. (A, B) knospenlose adulte Polypen; (C, D) knospenlose Jungtiere.

2.1.1.5.3 K10-7 und *kringelchen* werden an der Knospenbasis koexprimiert

Die Expression von *kringelchen*, einem Rezeptor für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor, startet während der Knospung in Stadium 4 als Ring an der Knospenbasis in ektodermalen Zellen des Muttertiers (Sudhop et al., 2004). Nach der Ablösung der Knospe ist die Expression noch ringförmig um die Ablösestelle nachweisbar. Im weiteren Verlauf zieht sich der Expressionsring zusammen bis er punktförmig erscheint und schließlich gänzlich verschwindet. Funktionsanalysen zeigten, dass Kringelchen essentiell an der Knospenablösung beteiligt ist (Sudhop et al., 2004).

Die Expression von *K10-7* startet im Knospenstadium 7 in räumlicher Nähe von *kringelchen*. Zur Abgrenzung der beiden Expressionen von *K10-7* und *kringelchen* während der Fußentwicklung bei der Knospung, wurde eine Doppelmarkierung durchgeführt. Dazu wurde die *kringelchen*-Sonde im Standardprotokoll mit Digoxigenin markiert und ihre Hybridisierungsorte mit BM Purple detektiert, die *K10-7*-Sonde wurde mit Biotin markiert und mit FAST-Red nachgewiesen.

Bis Stadium 6 ist nur *kringelchen* an der Knospenbasis nachweisbar (Abb. 21A und B). Eine Koexpression der beiden Gene findet im Stadium 7 statt (Abb. 21C und D). Zellen des Muttertiers exprimieren nur *kringelchen*, wohingegen Zellen der Knospe nur *K10-7* exprimieren. In einem schmalen Band um die Knospenbasis exprimieren Zellen sowohl *kringelchen* als auch *K10-7*. In dieser Region findet eine Umorientierung der Ausrichtung der Zellen, die aus dem Muttertier in die Knospe fließen, statt (Otto, 1977). Zu einem späteren Zeitpunkt in Stadium 7 kommt es zu einer eindeutigen Trennung der beiden Expressionsdomänen (Abb. 21E und F). Nun wird *kringelchen* nur noch von Zellen des Muttertiers und *K10-7* von Zellen der Knospe exprimiert. Zwischen den beiden Expressionsdomänen entsteht eine klare Grenze. In Stadium 10 ist die Fußregion der Knospe fast fertig differenziert und zwischen dem Gastralraum des Elterntiers und der Knospe besteht keine Verbindung mehr. Die strikte Trennung der beiden Expressionsdomänen ist noch immer aufrecht erhalten (Abb. 21G und H).

In dem sich bildenden Fuß der Knospe überlappen die Expressionsmuster von *kringelchen* und *K10-7* zunächst. Im weiteren Verlauf der Fußentwicklung kommt es zu einer klaren Abgrenzung der beiden Expressionsdomänen. Dabei exprimieren nur noch Zellen des Muttertiers *kringelchen*, wobei in Fußzellen der Knospe nur *K10-7* Expression nachweisbar ist.

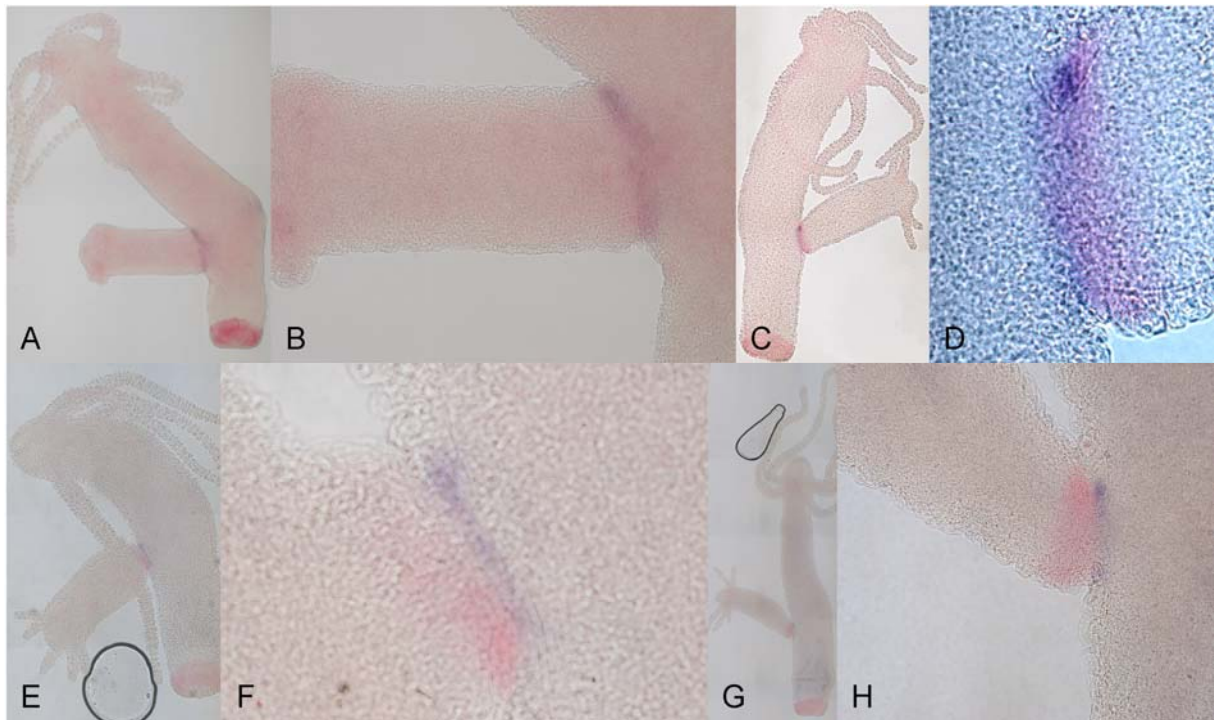


Abb. 21: *In situ* Hybridisierung zur Untersuchung der Koexpression von *K10-7* und *kringelchen* während der Knospung. Die Expression von *K10-7* wurde mit einer Biotin-markierten antisense-RNA Sonde und die Expression von *kringelchen* mit einer Digoxigenin-markierten antisense-RNA Sonde nachgewiesen. Der Nachweis der Hybride erfolgte mit Fast Red (rötliche Färbung) für *K10-7* und BM Purple (bläuliche Färbung) für *kringelchen*. (A, B) In Knospenstadium 6 ist *kringelchen* nur an der Knospenbasis nachweisbar. (C, D) Koexpression von *kringelchen* und *K10-7* im Übergang zwischen Muttertier und Knospe in einem frühen Stadium 7. (E F) Im späteren Stadium 7 kommt es zur Bildung einer Grenze zwischen der *kringelchen* und *K10-7* Expression. (G, H) In Knospenstadium 10 hat sich die *K10-7* Expression über die Basalscheibe der Knospe ausgebreitet, und ist deutlich abgegrenzt von der *kringelchen* Expression im Muttertier.

2.1.2 Die cDNAs *MK55* und *MK97*

Die Transkripte *MK55* und *MK97* wurden in einem Expressionsscreening einer LiCl induzierten cDNA Bank isoliert (Klenk, 1999).

2.1.2.1 Den cDNA-Sequenzen *MK55* und *MK97* fehlt das N-terminale Ende

Die Aminosäuresequenz der Transkripte *MK55* und *MK97* besitzen eine Sequenzähnlichkeit von 58.9% und werden daher nachfolgend gemeinsam besprochen.

Das Transkript von *MK55* ist 1379 bp groß (Abb. 22). Das 1253 bp große offene Leseraster kodiert ein 417 Aminosäure großes Peptid und besitzt ein Stop-Codon an der Position 1253 - 1255. Der Sequenz fehlt ein Start-Codon, weshalb die Aminosäuresequenz kein N-terminales Ende enthält. Die 3'-nicht translatierte Region umfasst 118 Nukleotide und enthält ein Polyadenylierungs-Signal an Position 1254 - 1259.

Die cDNA-Sequenz von *MK97* ist 1258 bp groß (Abb. 23). Dem offenen Leseraster, das eine Größe von 1162 Nukleotide hat, fehlt das Start-Codon. Das offene Leseraster kodiert ein Peptid mit aus 386 Aminosäuren. Diesem Peptid fehlt das N-terminale Ende. An Position 1162 – 1164 des Transkripts befindet sich ein Stop-Codon und an 1166 - 1171 ein Polyadenylierungs-Signal. Die 3'-nicht translatierte Region umfasst 87 Nukleotide.

Nächste Seite

Abb. 22: Nukleotidsequenz der cDNA *MK55* mit abgeleiteter Aminosäureabfolge. Die Nukleotide wurde vom 5' Ende in Richtung 3' Ende nummeriert, die Aminosäuren mit Beginn des offenen Leserasters. Das vermutliche Polyadenylierungs-Signal wurde grau unterlegt. Die Anfänge der einzelnen CRDs wurden mit Pfeilen und D1 – D4 markiert. D1/2 weist auf eine unvollständige CRD hin.

→ ½ D		
1	S G K S S C I I T A S N A V F G D P C V	20
1	CTCTGGAAAGTCGTCATGTATTATAACAGCATCCAACGCAGTATTTGGTGATCCATGCGT	60
→ D1		
21	G T Y K Y L E V Q F R C K P Q V P F A R	40
61	AGGAACATACAAATACCTCGAAGTGCAATTTAGATGTAAACCGCAAGTACCTTTGCGCAG	120
41	A C E G S N L K I D C N G K G L I E I L	60
121	AGCATGTGAAGGAAGCAATCTGAAAATTGATTGCAACGGGAAAGGATTAATTGAAATACT	180
61	D A N Y G R T V A G V C P G A N D L N T	80
181	TGATGCAAATTATGGGAGGACTGTGGCGGGAGTTTGCCCTGGTGCAAATGACTTAAATAC	240
81	K C D N K K K S L E I I H N L C S A K S	100
241	AAAGTGTGATAACAAAAAAGTCGCTAGAAATTATACACAATCTTTGCTCTGCAAAGTC	300
101	S C V I T A S N A V F G D P C V G T Y K	120
301	ATCATGTGTTATTACAGCATCCAACGCAGTGTTTGGTGATCCATGCGTAGGAACATACAA	360
→ D2		
121	Y L E V Q Y R C K S Q V P I A R A C E G	140
361	ATACCTGAAGTGCAATACAGATGTAAATCACAAGTACCTATTGCACGAGCATGTGAAGG	420
141	S D L K I D C N G K G L I E I V D A N Y	160
421	AAGCGATCTAAAAATAGATTGCAATGGGAAAGGATTAATTGAAATAGTTGATGCAAATTA	480
161	G R T V S G V C P G A N D L N T K C D N	180
481	TGGGAGAACTGTGTCTGGGTGTTTGCCCTGGAGCTAATGACTTAAATACAAAGTGTGATAA	540
181	K K K S L E I I H S T C S E K C S C T V	200
541	CAAAAAAAGTCGCTTGAAATAATTCATAGCACTTGCTCAGAAAAATGTTCTGTGTACCGT	600
201	K A S N N V F G D P C V G T Y K Y L E V	220
601	TAAAGCCTCCAACAACGTTTTTGGTGATCCATGCGTTGGAACATATAAAATACTTGAAGT	660
→ D3		
221	Q Y K C K P Q Y S V A R A C E G R D L K	240
661	GCAATATAAGTGCAAACCACAATATTCTGTTGCTCGAGCATGTGAAGGAAGGGATTTAA	720
241	I D C N G K G T I Q I V N A N Y G R T L	260
721	AATTGATTGTAATGGTAAAGGAACAATTCAAATAGTTAATGCAAACTATGGAAGAACTTT	780
261	P G V C P G A N D L N T K C D N R K K S	280
781	ACCTGGTGTGTTGTCCAGGTGCCAATGATTTAAATACAAAATGTGATAATAGAAAAAAGTC	840
281	L E V I Q N S C S D K C S C T V K A T N	300
841	ACTCGAAGTTATACAAAACAGCTGTTTCAGACAAGTGTCTTGTACTGTTAAAGCCACCAA	900
301	A V F G D P C I G T Y K Y L E V Q Y H C	320
901	TGCAGTGTGTTGGAGATCCATGTATAGGAACATATAAAATACCTAGAAGTACAATATCACTG	960
→ D4		
321	K S H S N V V R A C E G S D L K I E C S	340
961	TAAATCTCATTCAAACGTTGTACGAGCATGTGAAGGTAGTGATTTAAAAATAGAGTGTAG	1020
341	S N Q K I K V I Q A N Y G R T L S N V C	360
1021	TAGTAATCAAAAAATTAAAGTAATCCAAGCCAACCTACGGTAGAACTTTGTCTAATGTCTG	1080
361	P G T Q D S N T K C N N E K N T I E L V	380
1081	TCCTGGAACACAAGATTCAAACACAAAATGTAACAATGAAAAAATACAATTGAACTTGT	1140
381	N K N C S A K S S C T I K A S N A V F G	400
1141	TAATAAAAACGTTCAGCAAAATCTTCTGTACTATTAAAGCCTCAAATGCAGTATTTGG	1200
401	D P C V G R Y K Y L E V Q Y S C N *	417
1201	CGACCCATGTGTTGGAAGATATAAAATATCTTGAAGTGCAATACAGTTGCAACTAATAAAA	1260
1261	CGTTTTTTTATTGTTACATACTCATAAATGTATACTTCAATTTGAATTTAAATGTATTGA	1320
1321	GTTAATGATGGTATTAGTTTTTTTAAATATTTAAATAATGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1379

→ D1		
1	H A Q V L R T S R A C E G Y G L K I D C	20
1	TCATGCCCAAGTCTTACGCACTTCGCGAGCATGTGAAGGGTATGGGCTGAAAATTGATTG	60
21	T G Q G V I E V V S A N Y G R T L S N V	40
61	CACCGGTCAGGGAGTAATTGAAGTAGTCAGTGCAAATTATGGTAGAACGTTGTCTAATGT	120
41	C P G A Q S S N V K C N N Q A K S L E V	60
121	TTGTCTGGAGCACAATCTTCAAACGTAAATGTAATAATCAAGCAAAATCATTAGAAGT	180
61	A R N S C S G K S S C L I Q A T N A V F	80
181	TGCTCGTAACAGTTGCTCAGGCAAATCCTCGTGTCTTATTCAAGCAACCAATGCAGTTTT	240
81	G D P C V G T Y K Y L E V Q Y R C K I P	100
241	TGGCGATCCATGTGTTGGAACATACAAGTATCTTGAAGTACAATATCGATGTAAAATACC	300
→ D2		
101	V H V A R A C E G F N L K I V C D S H E	120
301	AGTGCATGTTGCACGAGCTTGCGAAGGTTTTAATCTAAAAATTGTTTGCATAGTCATGA	360
121	V I E V L N A N Y G R T L S N I C P G A	140
361	AGTAATTGAAGTGCTTAATGCAAACTATGGCAGAACATTATCTAATATTTGTCCTGGAGC	420
141	Q S S N V K C N N Q A K S L V V V R N S	160
421	ACAATCTTCAAACGTAAATGCAACAATCAAGCAAAATCATTAGTAGTTGTTTCGTAACAG	480
161	C S G K S S C V I Q A S N A V F G D P C	180
481	TTGCTCAGGTAAATCTTCGTGTGTCATCCAAGCATCCAATGCTGTTTTTGGCGATCCATG	540
→ D3		
181	V G T Y K Y L E V Q Y Q C K S P V R V A	200
541	TGTCGGAACATACAAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGCGTGTTGC	600
201	R A C E G S G L K I S C N G H G V I N V	220
601	GCGAGCATGTGAAGGTTCTGGTTTGAAAATATCTTGCAACGGTCATGGCGTAATTAATGT	660
221	L N A N Y G R T L S N I C P G A Q S S N	240
661	GCTCAATGCAAACTATGGTAGAACATTGTCTAATATTTGTCCTGGAGCACAACTTTCAA	720
241	T K C N N Q V K S L A V V R N S C S G R	260
721	CACCAATGTAATAATCAAGTAAATCATTAGCAGTTGTTGCAACAGTTGCTCAGGTAG	780
261	S S C G I Q A T N A V F G D P C V G T Y	280
781	ATCTTCGTGTGGCATCCAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTCGGAACATA	840
→ D4		
281	K Y L E V Q Y Q C I P Q V N V V R A C E	300
841	CAAATATCTTGAAGTGCAATATCAATGTATACCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGCGA	900
301	G S N L K I N C N G N G N I K V L Q A N	320
901	AGGAAGCAATCTAAAGATTAATTGCAACGGCAATGGAACATTAAAGTGTTGCAAGCGAA	960
321	Y G R K L S N V C P G A Q S T N I N C N	340
961	CTATGGTCGAAAGTTATCTAATGTTTGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTGCAA	1020
341	N Q G K S L A V T Q L Q C F G K P S C T	360
1021	TAATCAAGGAAAATCACTTGCAAGTAATCAATTACAATGTTTGGCAAACCTTCTTGTAAC	1080
361	V A A T N A V F G D P C V G T Y K Y L E	380
1081	TGTCGCGGCAACTAATGCAGTTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACATACAAATACCTTGA	1140
381	V M Y S C F *	386
1141	AGTGATGTATAGTTGTTTTTAAAGAAATAAA	1200
1201	GTTACTCAGAACTTTTGATGAAATATATGCTATAGTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1258

Abb. 23: DNA-Sequenz von MK97 mit der abgeleiteten Aminosäurenfolge. Die Nukleotide wurde vom 5' Ende in Richtung 3' Ende nummeriert, die Aminosäuren mit Beginn des offenen Leserasters. Das vermutliche Polyadenylierungs-Signal wurde grau unterlegt. Die Anfänge der einzelnen CRDs wurden mit Pfeilen und D1 – D4 markiert.

2.1.2.2 Im Northern Blot hybridisiert *MK55* mit einer und *MK97* mit zwei Banden

Da den cDNA-Sequenzen *MK55* und *MK97* das 5' Ende fehlt, wurde zur Größenbestimmung der Transkripte eine Northern Blot Analyse durchgeführt.

Die aus der *MK97* cDNA hergestellte Sonde hybridisiert mit einer einzelnen Bande der Größe 1,4 kb. Da die bekannte Sequenz von *MK97* 1258 Nukleotide groß ist, ist anzunehmen, dass das nicht vorhandene N-terminale Ende nur wenige Nukleotide umfasst.

Für die cDNA-Sequenz von *MK55* wurden zwei deutlich größere Transkripte mit den Größen 2,4 kb und 2,2 kb detektiert (Abb. 24). Es scheint, als gäbe es von *MK55* zwei Isoformen. Die Northern Blot Analyse zeigt aber auch, dass von den *MK55* Transkripten nur etwa die Hälfte der Sequenz bekannt ist.

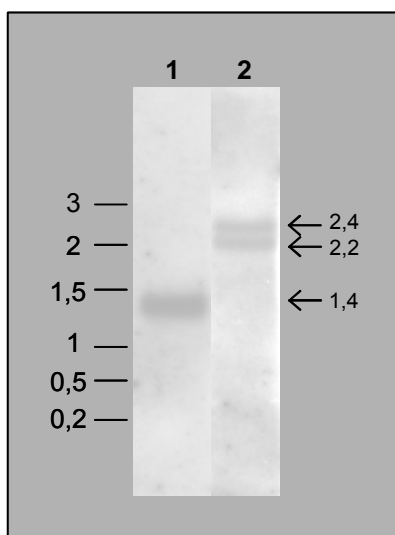


Abb. 24: Northern Blot Analyse der Transkripte von *MK55* und *MK97*. Poly(A)+-RNA (4 µg) wurde unter stringenten Bedingungen mit den ^{32}P -markierten Sonden für *MK97* (1) oder *MK55* (2) hybridisiert. Links ist die Markergröße und rechts die Größe der einzelnen Banden in kb angegeben.

2.1.2.3 *MK55* und *MK97* haben Sequenzähnlichkeit mit Rhamnose-bindenden Lektinen

Die Datenbankanalyse der Transkripte *MK55* und *MK97* ergab eine Sequenzähnlichkeit mit der Proteinfamilie der Rhamnose-bindenden Lektine (RBL). Diese Proteine bilden eine eigene Familie und können nicht zu den bereits bekannten Klassen der C-Typ Lektine oder Galaktine gezählt werden (Hosono et al., 1999). RBLs wurden aus dem Seeigel *Anthocidaris crassispina* als SUEL (Ozeki et al., 1991), sowie aus den Eiern von Wels (*Silurus asotus*) als SAL (Hosono et al., 1999), aus Forelle (*Oncorhynchus mykiss*) als STL1, STL2 und STL3, aus Saibling (*Salvelinus leucomaenis*) als WCL1 und WCL3 (Tateno et al., 2002) und aus Ponyfisch (*Leiognathus nuchalis*) als PFL-1 (Okamoto et al., 2005) isoliert. Die Rhamnose-bindenden Lektine besitzen die Fähigkeit Erythrozyten von Hase und Mensch zu agglutinieren. Die Bindung ist durch L-Rhamnose und α -Galactoside stärker als durch β -Galactoside inhibierbar (Krajhans, 1990). Dafür verantwortlich ist die Kohlenhydrat Erkennungsdomäne (carbohydrate recognition domain, kurz CRD) (Tateno et al., 2001). Charakteristisch für die ca. 95 AS große CRD sind acht konservierte Cysteine und zwei Aminosäureabfolgen, das YGR-Motiv und das DPC-Motiv (Tateno et al., 1998; Hosono et al., 1999). Der N-Terminus der CRD enthält das YGR-Motiv mit der Aminosäuresequenz (AN)YGR(TD)S(T)XCS(TGR)P. Die Aminosäuren in der Klammer sind weniger stark konserviert. Das DPC-Motiv befindet sich am C-terminalen Ende der CRD und besteht aus den Aminosäuren DPCX(G)T(Y)KY(L). Auch hier gilt wiederum dass Aminosäuren, die in Klammer gesetzt sind, weniger stark konserviert sind. Die CRD kommt in unterschiedlicher Anzahl in den Proteinen vor. SUEL besitzt nur eine CRD, PFL-1, STL2, STL3 und WCL3 besitzen zwei, und STL1, SAL und WCL1 jeweils drei CRDs (Abb. 25) (Okamoto et al., 2005, Hosono et al., 1999; Tateno et al., 2001 und Tateno et al., 2002). Ob ein WCL2 existiert ist unklar. Auffällig ist, dass STL1 und WCL1 in der ersten CRD kein YGR-Motiv besitzen. *MK55* und *MK97* besitzen vier vollständige CRDs (Abb. 25). Die N-terminale Sequenz von *MK55* beinhaltet sogar noch das C-terminale Ende einer weiteren CRD.

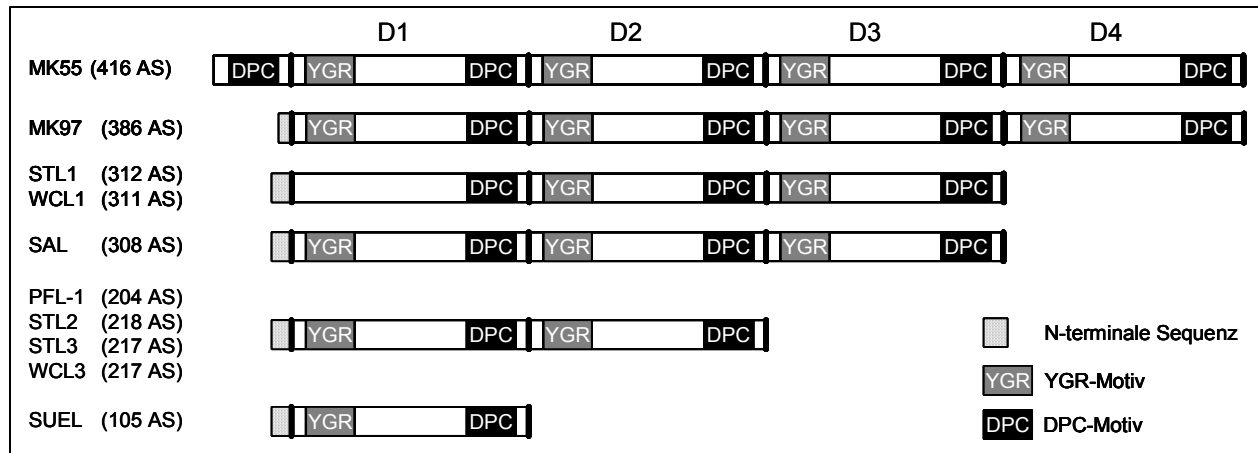


Abb. 25: Schematische Darstellung der Proteinstruktur bekannter Rhamnose-bindenden Lektine (RBL). Die einzelnen CRDs sind hintereinander angeordnet. Mit Ausnahme von STL1 und WCL1 besteht jede dieser Wiederholung aus einem YGR- und einem DPC-Motiv. Die einzelnen Wiederholungen sind als D1 bis D4 benannt. Hinter dem Proteinnamen ist die Größe der Proteine in Aminosäuren angegeben.

Das Alignment wurde mit den CRDs von MK55, MK97 und den bekannten RBL Proteinen durchgeführt (Abb. 26).

Die CRD D2 von MK55 und MK97 aligniert mit den CRDs D1 von WCL1, STL1 und SAL1. Die höchste Sequenzidentität besitzen MK55 und SAL mit 26,8%. Die CRD D3 von MK55 und MK97 aligniert mit D1 von PFL-1, SUEL, STL2, WCL3, STL3 und D2 von WCL1, STL1 und SAL. SUEL zeigt mit 43,8% die höchste Sequenzidentität zu MK55 und MK97. Die letzte CRD von MK55 und MK97 (D4) aligniert mit D2 von PFL-1, STL2, WCL3, STL3, sowie mit D3 von WCL1, STL1 und SAL. Die höchste Sequenzidentität von 44,4% dieser Gruppe besitzt SAL mit MK55.

Nächste Seite

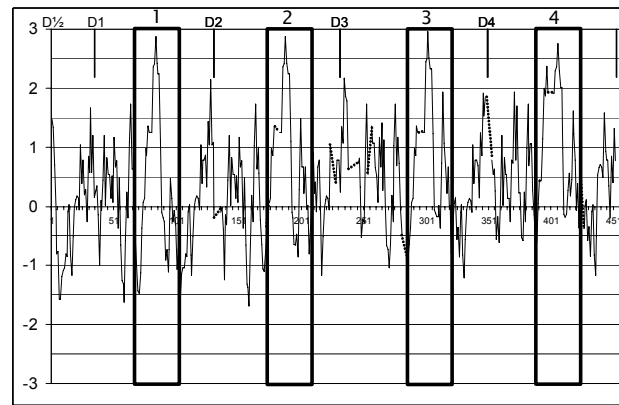
Abb. 26: Alignment der CRD der Rhamnose-bindenden Lektine. Für das Alignment wurden die CRDs von PFL-1 (AB212796), SAL (AB020571), STL1 (AB039022), STL2 (AB039023), STL3 (AB039024), SUEL (P22031), WCL1 (AB077045), WCL3 (AB077046), MK55 und MK97 benutzt. Übereinstimmungen der Sequenzen mit den konservierten Merkmalen einer CRD wurden dunkelgrau, weniger stark konservierte Merkmale hellgrau markiert. In der Klammer hinter den einzelnen CRD ist zuerst die Sequenzidentität zu MK55 und dann zu MK97 in Prozent angegeben. Die Klammer hinter der CRD von MK97 gibt die Identität zu MK55 wieder.

MK55	D1	1	SGKSSC-IITASNAVFGDPCVGHYK---YLEVQFRCKPQ----	35
MK55	D1	36	-----VPTARACEG--SNLKIDGNGKGLIEILDANYGRTVAGVOP--GANDLN---TKCDNKKKSLEIIHNLCSAKSSC-VITASNAVFGDPCVGHYK---YLEVQYRCKSQ----	131
MK97	D1	6	-----RUTRACEG--YGLKIDGTGGVIEVVSANYGRTLSTNYCP--GAQSSN---VKCNNAQKSLEIARNSCSGKSSC-LIQTATNAVFGDPCVGHYK---YLEVQYRCKP-----	100 (64,0)
			ANYGRDSTXCS--TGRP	
WCL1	D1	22	---MSEIRHRLTCGD---PSLQCD-DGVIIVYGKVFSTIEK-SSN---ESP-----KACS-DTEAFNGVSKRODGNKGC-DVATSGSVC--LONSAYQNNIFLDVYGCGLV----	113 (26,8/25,7)
STL1	D1	24	---MSEIQRLFLTCGD---PSLQCD-HGVIIMVYGQFSTIEKLYSN---ERP-----KACS-DTEAFNGVSNRCDGNEKC-DVATSGSVC--LQSTAVLTNIFLDVYGCGLV----	117 (21,3/24,2)
SAL	D1	24	-----ANMITCYG--DVQKLHCE-TGLIIVKSSLYGRDSTTTC--TNRFPQAVAVTCS-LP--ITIGDRQNGLPDC-ELKTDLLGNTDPCQGHYK---YNTSFDCING----	118 (26,8/25,7)
MK55	D2	132	-----VPTARACEG--SDLKIDGNGKGLIEILDANYGRTVAGVOP--GANDLN---TKCDNKKKSLEIIHNLCSAKSSC-VITASNAVFGDPCVGHYK---YLEVQYRCKPQ----	227
MK97	D2	101	-----VHVARACEG--FNLKIVDSDSHEVIEVLNANYGRTLSTNYCP--GAQSSN---VKCNNAQKSLEIARNSCSGKSSC-VIQTASNAVFGDPCVGHYK---YLEVQYRCKSP----	196 (64,4)
			ANYGRDSTXCS--TGRP	
SUEL	D1	1	ELVSEFCLKERVCE--SSLTISQPEGEGIVYDAIYGRKRGEVPGFLGFAFTKN---RKCRS-SNSQVQWENSCEGKSSC-TVLASNSVFGDPCVGHYK---YLAVTYICSF----	105 (43,8/43,8)
PFL1	D1	13	VRETACEG--SVATLECGHQDIHVVSANYGRLDKSCTS--DKSDFSVRNTEC-SGPADL-VAT-PCNGKTSC-TIEASNSVFGDPCVGHYK---YLEVSICENH----	108 (40,5/40,5)
STL2	D1	24	-----TRVTCNGENVQFLI CD-SGVI FIERALYGRDSTTTC--EGRFANQLTNTQC-SQTGTLEVLSCQKQVC-EVNTVEFRTSDPCVGHYK---YLETYTICIPA----	122 (31,3/33,3)
WCL3	D1	23	-----AISITCEG--SDALLQD--GGKIQIKRANYGRHDVCS--IGRPNQDLTNTCLS--TSSKMAERCGKSEC--IVPASNFVFGDPCVGHYK---YLDIKYSCVQOQET--	122 (36,8/36,8)
STL3	D1	23	-----AISITCEG--SDALLQD--GGKIQIKRANYGRHDVCS--IGRPNQDLTNTCLS--TSSKMAERCGKSEC--IVPASNFVFGDPCVGHYK---YLDIKYSCVQOQET--	122 (36,8/37,8)
WCL1	D2	114	-----SKKVTTCGA-GVVHLECG-DGVVFLQKALYGRDSTRTCS--QGRPQSLTNTKCS-QEGTIALWSQRCDGKQMC-EVNMVRNQISDPCVGHYK---YLDVYICLFA----	213 (32,6/33,6)
STL1	D2	118	-----SKKVTTCGA-GVVHLECG-DGVVFLQKALYGRDSTRTCS--QGRPQSLTNTKCS-QEGTIALWSQRCDGKQMC-EVNMVRNQISDPCVGHYK---YLDVYICLFA----	214 (29,7/33,6)
SAL	D2	119	-----NYAVICEH--GYSTLDQD-NDAILIIVNANYGRASSQICSN--GLFNGLTQNTNCTY-AANTLTITVAGLNGKSC-TVEALNTIFSDPCVGHYK---YLTVTYICT----	213 (40,4/38,3)
MK55	D3	228	-----YSVARACEG--RDLKIDGNGKGTIIVNANYGRTLSTNYCP--GANDLN---TKCDNKKKSLEIARNSCSGKSSC-TVKATNAVFGDPCVGHYK---YLEVQYHCKS----	322
MK97	D3	197	-----VRVARACEG--SGLKISGNGHGVINVLNANYGRTLSTNYCP--GAQSSN---TKCNNAQKSLEIARNSCSGKSSC-GIQTATNAVFGDPCVGHYK---YLEVQYQICP----	291 (66,3)
			ANYGRDSTXCS--TGRP	
PFL1	D2	109	-----VLIICEN--DLAQLODDPERINVLNANYGRHDSTTTC--EGRFVSDLMRTDC-SMDTDTISAD-CSGAHTCYIVANNMWLGGDPCSDIFK---YLEVYACQHE----	204 (29,4/32,3)
STL2	D2	123	-----TRSIITCEG--SDAQLEED-EGTIQIYSANYGRDRDLVCS--FKRPNQLANTNCLSQSITTSKVAERCNKGTQC-DVPASNSLYGDPVGHYK---YLEVAYTCG----	218 (42,4/42,4)
WCL3	D2	123	-----ISIIICEG--SDSLLQD-RGEIRIRLANYGRHDVCS--IGRPNQDLTNTCLS--TSSKMAERCGKSEC--IVKVSNSVFGDPCVGHYK---YLDVAYTCY----	217 (40,4/40,4)
STL3	D2	123	-----ISIIICEG--SDSLLQD-RGEIRIRLANYGRHDVCS--IGRPNQDLTNTCLS--TSSKMAERCGKSEC--IVKVSNSVFGDPCVGHYK---YLDVAYTCY----	217 (41,4/42,4)
WCL1	D3	214	-----KTSITCEG--STSSLDQD-KGVINVFHANYGRDSTGTC--AGR--HELSONCL-QPKTLDVVKQCEGKQCC-TVGLD-PVFGDPCVGHYK---YLEVSYTCLGGSPTV	311 (36,1/39,0)
STL1	D3	215	-----KTSITCEG--STSSLDQD-KGVINVFHANYGRDSTGTC--AGR--HELSONCL-QPKTLDVVKQCEGKQCC-TVGLD-PVFGDPCVGHYK---YLEVSYTCLGGSPTV	312 (38,0/40,0)
SAL	D3	214	-----KEMVVCCEG--GSASINCEG-AQTIKTIWANYGRDSTTTC--TGRPGQLLNTNCTY-TSDTLNKAACODHLSTC-TIPANNNNFFGDPVGHYK---YLRIVVACV----	308 (44,4/40,4)
MK55	D4	323	-----HSNVVRACEG--SDLKIEGSSNQIKVIOANYGRTLSTNYCP--GTQDSN---TKCNNEKNTIELVNKNSAKSSC-TIKASNAVFGDPCVGHYK---YLEVQYSON----	417
MK97	D4	292	-----QNVNVRACEG--SNLKIKINGNGNGLKVLOANYGRTLSTNYCP--GAQSSN---INCNNQKSLAVTQLOCFGRFSC-TVAAATNAVFGDPCVGHYK---YLEVMSYCF----	386 (63,1)
			ANYGRDSTXCS--TGRP	

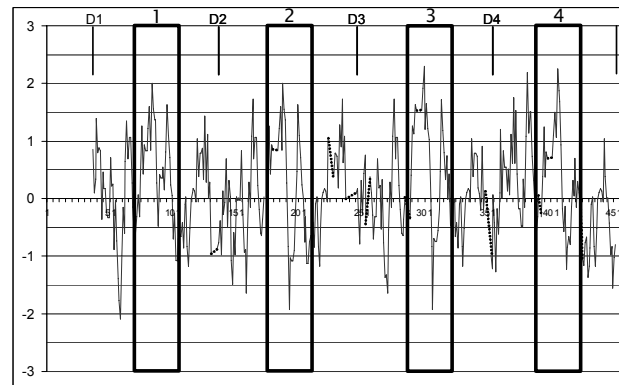
Der Vergleich der einzelnen CRDs von MK55 und MK97 mit den CRDs der RBL Familienmitglieder zeigte nur eine geringe Sequenzidentität. Um mehr Information über die Struktur der CRDs zu erhalten wurde von allen die Hydrophilie nach Kyte und Doolittle (1982) mit Hilfe des Programms Peptidestructure (HUSAR, DKFZ, Heidelberg) bestimmt. Es zeigte sich, dass die Hydrophilie der einzelnen CRDs zwar variieren, aber dennoch ähnlich sind. Wie von der Sequenzidentität von 85,2% bei STL1 und WCL1, so wie von 91,2% bei STL3 und WCL3 zu erwarten war, besitzen diese Proteine auch eine nahezu identische Hydrophilie (nicht gezeigt). Im Vergleich der Hydrophilie weist MK55 die größte Ähnlichkeit mit STL3/WCL3 auf. Dabei ist das Muster der CRD D3 von MK55 der der STL3/WCL3 D1 sehr ähnlich (Abb. 27).

Das Muster hydrophiler Aminosäuren der CRD von MK97 zeigt Ähnlichkeiten mit den STL1/WCL1 CRDs. Ist zwischen D2 von MK97 und D1 von STL1/WCL1 noch kein signifikantes Muster erkennbar, so besitzen D3 von MK97 und D2 von STL1/WCL1 ein ähnliches Muster. D4 von MK97 besitzt wie D3 von STL1/WCL1 viele hydrophile Aminosäuren (Abb. 27).

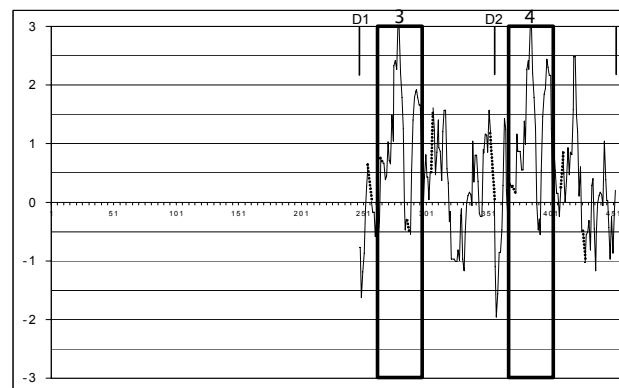
Vergleicht man die Hydrophilie von MK55 und MK97, so zeigt sich, dass der C-terminale Teil eine höhere Übereinstimmung im Hydrophiliemuster aufweist, als der N-terminalen Teil (Abb. 27).



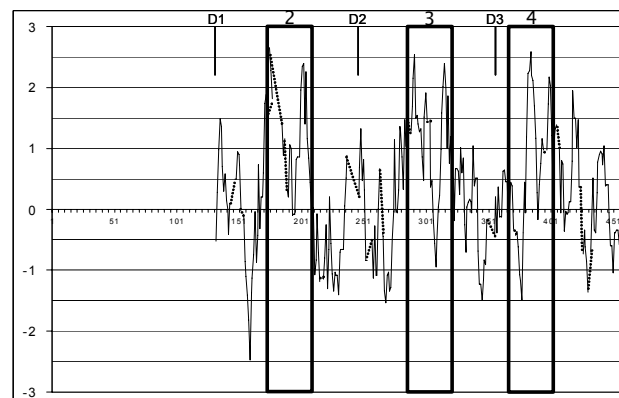
MK55



MK97



WCL3



STL1

Abb. 27: Hydrophilieplot einzelner RBL Proteine. Die Hydrophilie wurde nach Kyte und Doolittle (1982) bestimmt und gemäß dem Alignment (Abb. 26) aufgetragen. Lücken wurden mit gestrichelten Linien dargestellt. Die Grenzen der einzelnen CRDs wurden mit senkrechten Strichen dargestellt und D1 - D4 benannt. Ähnliche Muster wurden eingerahmt und mit 1 – 4 beschriftet. An der Nulllinie ist die jeweilige Position im Alignment wiedergegeben.

2.1.2.4 *MK55* und *MK97* haben Ähnlichkeit mit einer großen Gruppe von Sequenzen aus einer EST-Datenbank

Bei der Analyse einer EST-Datenbank wurden 103 Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu den RBLs gefunden. Sechs davon waren aus *Hydractinia echinata*, eine aus *Hydra oligactis* und 96 aus *Hydra magnipapillata*. Von diesen EST-Sequenzen zeigen vier Sequenzen mit *MK55* und 30 Sequenzen mit *MK97* Übereinstimmungen. EST-Sequenzen, die nur eine geringe Sequenzähnlichkeit mit *MK55* und *MK97* zeigten, wurden in 14 Gruppen unterteilt. Mit vier EST-Sequenzen aus *H. echinata* konnte eine Konsensussequenz eines vollständigen RBLs erstellt werden.

2.1.2.4.1 EST-Sequenzen von *H. magnipapillata* mit einer Ähnlichkeit zu *MK55*

Die in einer Datenbankanalyse isolierten EST-Sequenzen von *H. magnipapillata* sind nahezu 100% identisch mit *MK55* (Tabelle 5).

Tabelle 5: EST-Sequenzen, die eine Sequenzähnlichkeit zu *MK55* besitzen.

Acc.-Nr.	Orientierung der Sequenz	Sequenzähnlichkeit zu <i>MK55</i> [%]	Größe [bp]
CA301986	3'-5'	99,6	606
CD267291	3'-5'	99,3	591
CD566988	3'-5'	99,3	629
CA302255	5'-3'	99,5	625

Das Transkript *CA302255* weist Sequenzähnlichkeit mit dem 5'-Ende, die Sequenzen *CD566988*, *CD267291* und *CA301986* mit dem 3' Ende von *MK55* auf. An sechs Stellen unterscheiden sich die EST-Sequenzen von *MK55*. *CA302255* besitzt ein Guanin anstelle des Adenins von *MK55* (Position 301) und ein Tyrosin anstelle eines Adenins (Position 393). *CD566988* und *CD267291* fehlen das Cytosin von *MK55* an Position 968. Dies führt zu einem Leserasterschub, der in der folgenden Sequenz nicht mehr ausgeglichen wird. An Stelle des Thymins an Position 1034 von *MK55* besitzt *CD566988* ein Adenin. Hingegen ist Thymin von 1035 bei *CD267291* durch ein Adenin ersetzt. Das Cytosin von Position 802 aus *MK55* ist bei allen EST-Sequenzen durch ein Thymin ersetzt. Das Alignment der vier EST-Sequenzen mit *MK55* ist im Anhang 7.2.1 beigefügt.

2.1.2.4.2 EST-Sequenzen von *H. magnipapillata* mit einer Ähnlichkeit zu *MK97*

Zu der cDNA *MK97* konnte in einer EST-Datenbank 32 Sequenzen identifiziert werden, die eine Sequenzähnlichkeit von über 93% besitzen (Tabelle 6).

Tabelle 6: EST-Sequenzen, die eine Sequenzähnlichkeit zu MK97 besitzen. Sequenzen die mit dem 5'-Ende von MK97 alinieren sind grau unterlegt, Sequenzen die ein mögliches Start-Codon tragen sind unterstrichen

Acc.-Nr.	Orientierung der Sequenz	Sequenzähnlichkeit zu MK97 [%]	Größe [bp]
CF601388	5'-3'	98,0	560
CF658427	5'-3'	99,2	590
CK593934	5'-3'	95,0	585
CK593703	5'-3'	93,6	569
CV464140	5'-3'	99,4	698
CV660179	5'-3'	99,2	734
CV985431	5'-3'	98,7	626
CV985984	5'-3'	98,7	528
CV223232	5'-3'	98,8	611
CB888371	3'-5'	99,3	608
CB888374	3'-5'	99,5	605
CB888376	3'-5'	98,5	549
CB888380	3'-5'	99,6	620
CB890945	3'-5'	98,4	585
CD266880	3'-5'	99,6	627
CD268324	3'-5'	99,8	620
CD285895	3'-5'	98,6	608
CD681714	3'-5'	98,5	626
CF656230	5'-3'	99,6	593
CF656720	3'-5'	99,3	628
CF658893	3'-5'	98,6	643
CF778575	3'-5'	98,8	504
CF778867	5'-3'	99,2	551
CN550982	3'-5'	95,4	618
CN569267	3'-5'	93,6	599
CN622659	5'-3'	98,9	590
CN623089	3'-5'	97,4	518
CN628156	5'-3'	99,1	585
CN771549	5'-3'	98,0	467
CN777636	3'-5'	98,3	433

Die Sequenzen *CF601388*, *CF658427*, *CK593934*, *CK593703*, *CV464140*, *CV660179*, *CV985431*, *CV985984* und *CV223232* zeigen mit dem 5' Ende von MK97 (Tabelle 5). Davon besitzen die Sequenzen *CF658427*, *CK593934*, *CV464140*, *CV660179*, *CV985431* und *CV985984* ein mögliches Start-Codon. Die verbleibenden 23 Sequenzen alinieren mit dem 3' Ende von MK97. Das Alignment der EST-Sequenzen mit MK97 ist im Anhang 7.2.2 beigefügt.

2.1.2.4.3 Die Konstruktion eines mögliches RBL aus *H. echinata*.

Aus einer EST-Datenbank von *Hydractinia echinata* wurden vier Sequenzen isoliert, die für ein mögliches Rhamnose-bindendes Protein kodieren (Tabelle 7).

Tabelle 7: EST-Sequenzen zur Bildung einer Konsensussequenz eines möglichen RBLs von *H. echinata*.

Acc.-Nr.	Orientierung der Sequenz	Größe [bp]
CO372116	5'-3'	555
CO540567	5'-3'	552
CO372356	3'-5'	447
CO536150	3'-5'	717

Das Alignment der vier Nukleotidsequenzen zeigt, dass die Sequenzen CO372116 und CO540567, sowie die Sequenzen CO372356 und CO536150 nahezu identisch sind (Anhang 7.2.3). Die 3'-Enden der Sequenzen CO372116 und CO540567 sind in mehr als 240 Nukleotiden nahezu identisch mit dem 5'-Ende von CO536150. Aufgrund dieser Sequenzidentität, wurde eine Konsensussequenz aus den vier Sequenzen gebildet (Abb. 28).

1	M K I S A S L I A L Y L M	13
1	CAAGTTACTTGAGAA <u>ACCAGAATGAAGATTT</u> CAGCTTCGTTGATCGCGTTGTATTTGATG	60
	→ D1	
14	F Y V V S G I T V C E H K T L S I K C P	33
61	TTTTACGTTGTGTCTAGGCATTACTGTCTGTGAACACAAAACGTTGAGCATCAAATGTCCA	120
34	Q G A A I I I T S A N Y G R L S K K I C	53
121	CAAGGAGCAGCTATTATAATAACATCTGCAAACCTACGGACGACTTTCCAAAAAATCTGC	180
54	K S S T S R R T T T C R A P K S L R I V	73
181	AAAAGTTCAACTTCGCGACGTACAACCACATGTAGAGCACCGAAATCATTACGTATAGTC	240
74	K A I C D G K R S C K I P A K N E M F D	93
241	AAAGCGATTTGTGATGGCAAACGATCGTGCAAATTCCTGCAAAAAATGAAATGTTTGAT	300
	→ D2	
94	D P C ^{Y_M} G V Y K ^{Y_V} L K V T F M C K V P G	113
301	GATCCATGT ^{T_A T_G} GGTGTTTATAA ^{G_A T_A T_A} TTGAAAGTCACTTTTCATGTGCAAGGTACCTGGA	360
114	P Q E V A C E R S R L K L K C P P A Q F	133
361	CCACAGGAAGTTGCTTGCGAGAGAAGTCGATTAAAGTTGAAATGTCTCCTGCACAATTT	420
134	I R I T Y A N Y G R Y S K K I C P V S T	153
421	ATCCGCATAACCTACGCAAACCTATGGCCGATATTCCAAGAAAATTTGTCCAGTATCCACT	480
154	V H Y P Y K G A C W A A S S F A E ^{V_I} S G	173
481	GTCCACTATCCTTATAAAGGTGCTTGTTGGGCAGCATCGTCTTTTGCTGAA ^{G_A} TCAGCGGT	540
174	V C N G R R S C S V H A T N K V F G D P	193
541	GTTTGCAATGGAAGACGCTCGTGCAGTGTTACGCG ^{C_A} ACCAACAAAGTTTTTCGGGGATCCT	600
	→ D3	
194	C P G V Y K Y L A V R Y T C V L P P R S	213
601	TGCCC ^{T_G} GGCGTCTACAAATATTTGGCTGTGCGGTATACTTGTGTATTACCACCTCGTTCC	660
214	R T A C E R R K L N L L C P P G F K I L	233
661	AGAACAGCCTGTGAACGCCGGAATTAATTTACTTTGTCTCCTGGCTTTAAATTTCTG	720
234	I T S A N Y G R R S K Y I C P G S N S G	253
721	ATTACATCTGCTAATTACGGCAGACGTTTCGAAATATATTTGTCTGTTCAAATTTCTGGC	780
254	T T T T C R D R S S F S I V A K K C N G	273
781	ACCACCACCACTTGCAGAGATCGTTCATCGTTTTTCTATAGTGGCGAAAAAATGCAATGGA	840
274	K P S C S I S A S N E V F S D R C K G V	293
841	AAACCTTCCTGTTCCATCTCTGCTTCAAATGAAGTTTTTTAGTGACCGCTGCAAGGGAGTA	900
294	F K Y L K A T Y L C V *	304
901	TTCAAGTATTTGAAAGCGACGTACCTGTGTGTTTGAGTGTA CACTACTTTTCAATCTTGTA	960
961	ACGATCTTATTTCACTTATTTATGATACCTTAAATATATTTTCAAAAACTGAAAAAAA	1020
1021	AAAAAA	1026

Abb. 28: Konsensussequenz eines möglichen RBLs aus *H. echinata*. Die Konsensussequenz wurde aus den EST-Sequenzen CO540567, CO372116, CO536150 und CO372356 gebildet. Sequenzabweichungen wurden durch hoch- bzw. tiefgestellte Buchstaben dargestellt. Hochgestellte Nukleotide im Triplet kodieren für hochgestellte Aminosäuren. Die Sequenzabweichungen von CO536150 zu CO540567 wurde durch graue, die von CO372116 zu CO540567 durch kursive Buchstaben gekennzeichnet. Abweichungen von CO373256 zu CO536150 wurden fett unterstrichen. Das mögliche Initiations-Kodon mit dazugehöriger Kozak-Sequenz wurde unterstrichen. Ein Polyadenylierungs-Signal fehlt. Der Beginn der einzelnen CRDs wurde mit einem Pfeil markiert und der Reihenfolge nach mit D1 – D3 nummeriert.

Die Konsensussequenz besteht aus 1026 Nukleotiden und besitzt an Position 22 – 24 ein mögliches Start-Codon (Abb. 28). Diese Start-Codon erfüllt in den Positionen -5 bis -3 die Kozak Kriterien (Kozak et al., 1987) für eine effiziente Translation (siehe auch 2.1.1.1). Das Stop-Codon befindet sich an Position 934 - 936. Das offene Leseraster umfasst 912 Nukleotide und kodiert ein 304 Aminosäure großes Protein. Die 75 Nukleotide große 3'- nicht translatierende Region besitzt kein Polyadenylierungs-Signal.

Auf Grund leicht unterschiedlicher Nukleotidsequenzen der einzelnen Transkripte kommt es zu Variationen in der Aminosäurefolge. Die Abweichungen wurden in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz gekennzeichnet (Abb. 28). Die Sequenz *CO536150* weicht in den Nukleotidpositionen 310-312, 324, 325-327 und 576 von den Sequenzen *CO540567* und *CO372116* ab. Die Nukleotidabweichung an Position 310-312 hat zur Folge, dass *CO536150* anstelle eines Tyrosins ein Methionin kodiert. Die Abweichung an Position 325-327 führt dazu, dass *CO536150* ein Valin anstelle eines Tyrosins kodiert. Die Nukleotide an Position 324 und 576 liegen an dritter Stelle im Triplet 322 – 324 und 574 – 576. Ihre Sequenzabweichungen haben keine Auswirkung auf die zu kodierende Aminosäure. Die Sequenzabweichungen an den Positionen 310-312 und 325-327 könnten durch Sequenzierungsartefakte hervorgerufen worden sein, da sie am 3'-Ende der EST-Sequenz *CO536150* liegen. Erfahrungsgemäß sind Sequenzierungen am 3'-Ende oft ungenau. Eine Überprüfung der Rohdaten könnte helfen die Richtige Sequenz zu bestimmen.

An Position 532 kommt es zu einer Sequenzabweichung zwischen *CO372116*, *CO536150* und *CO540567*. An dieser Position besitzt *CO372116* ein Adenin anstelle eines Guanins. Aufgrund dieser Positionsänderung kodiert *CO372116* ein Isoleucin, wohingegen *CO536150* und *CO540567* ein Valin kodieren. Auch hier könnte ein Sequenzierungsartefakt vermutet werden.

Die Konsensussequenz trägt eine letzte Abweichung an Position 606. Hier besitzt die Sequenz *CO372356* ein Guanin und *CO536150* ein Thymin. Da dieses Nukleotid jedoch die dritte Stelle des Triplets 604 - 606 bildet und sowohl CCT als auch CCG für Prolin kodieren, hat diese Sequenzabweichung keinerlei Auswirkung auf die Aminosäuresequenz.

Die Aminosäurenabfolge der Konsensussequenz enthält drei CRDs (Abb. 28), und zeigt eine Sequenzidentität von 27,4% bzw. 30,6% den RBL CRDs von MK55 und MK97.

2.1.2.4.4 EST-Sequenzen von *H. magnipapillata*, *H. echinata* und *H. oligactis* mit Ähnlichkeit zu Rhamnose-bindenden Lektine.

Die restlichen 69 EST-Sequenzen wurden in 14 Gruppen unterteilt. EST-Sequenzen die untereinander eine hohe Sequenzähnlichkeit (über 90%) besaßen wurden zu den Gruppen 1 bis 13 zusammengefasst. Alle übrigen EST-Sequenzen wurden der Gruppe Reste zugeteilt (Tabelle 9). Hier wurden auch zwei EST-Sequenzen von *H. echinata* und eine Sequenz von *H. oligactis* eingeordnet.

Tabelle 8: EST-Sequenzen der Gruppen 1 bis 13.

Gruppen-Nr.	Acc.-Nr.	Orientierung der Sequenz	Größe [bp]
Gruppe 1	CA301986	3'-5'	606
	CD267291	3'-5'	591
	CD566988	3'-5'	629
Gruppe 2	CN553533	5'-3'	539
	CN554347	5'-3'	519
	CN628929	3'-5'	556
Gruppe 3	CN625684	3'-5'	680
	CN626020	5'-3'	541
	CV042020	3'-5'	726
Gruppe 4	CN628949	3'-5'	444
	CN768749	3'-5'	578
	CN776391	5'-3'	461
Gruppe 5	CA301909	3'-5'	334
	CO538746	5'-3'	530
	CV564670	3'-5'	613
Gruppe 6	CA302112	5'-3'	443
	CV514626	5'-3'	660
	CV887922	5'-3'	661
Gruppe 7	CV862903	5'-3'	723
	CV863210	5'-3'	581
Gruppe 8	CF655949	5'-3'	616
	CV285899	3'-5'	616
	CV286124	5'-3'	615
Gruppe 9	CB889360	3'-5'	677
	CF657481	3'-5'	655
	CO538253	5'-3'	354
	CV465803	3'-5'	696
Gruppe 10	CN630682	3'-5'	553
	CN630994	5'-3'	576
Gruppe 11	CN564934	5'-3'	550
	CN565135	3'-5'	301
	CN565393	5'-3'	351
Gruppe 12	CN568002	3'-5'	387
	CN568249	3'-5'	387
	CN568250	5'-3'	387
Gruppe 13	CN564128	3'-5'	607
	CN564716	3'-5'	539

Tabelle 9: EST-Sequenzen Gruppe Reste

Acc.-Nr.	Spezies	Orientierung der Sequenz	Größe [bp]
CA302255	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	625
CB890984	<i>H. magnipapillata</i>	3'-5'	615
CD567470	<i>H. magnipapillata</i>	3'-5'	502
CF657006	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	592
CK593703	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	569
CK593703	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	569
CN553533	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	539
CN558694	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	414
CN568003	<i>H. magnipapillata</i>	3'-5'	387
CN569285	<i>H. magnipapillata</i>	3'-5'	535
CN569523	<i>H. magnipapillata</i>	3'-5'	339
CN629145	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	591
CO536184	<i>H. echinata</i>	3'-5'	584
CO539845	<i>H. echinata</i>	5'-3'	314
CV284362	<i>H. oligactis</i>	3'-5'	368
CV863359	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	822
CV863359	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	608
CV985984	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	528
CX054675	<i>H. magnipapillata</i>	3'-5'	499
CX054966	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	574
CX055771	<i>H. magnipapillata</i>	3'-5'	406
CX056024	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	714
CX056115	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	600
CX633556	<i>H. magnipapillata</i>	3'-5'	677
CX633698	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	662
CX634248	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	680
CX769928	<i>H. magnipapillata</i>	3'-5'	278
CX770205	<i>H. magnipapillata</i>	5'-3'	629

2.1.2.5 Die Expression von *MK55* und *MK97*

2.1.2.5.1 Die Expression von *MK55* und *MK97* in morphogenetisch aktiven Tieren

Im intakten Fuß wird das Transkript *MK55* in den ektodermalen Epithelzellen der Fußscheibe bis zum apikalen Rand der Fußregion exprimiert. (Abb. 29A). Kontrollversuche mit einer sense-RNA Sonde ergaben keine Färbung der Polypen (Abb. 29B). Um die Expression während der Fußregeneration zu untersuchen, wurde das untere Fünftel des Polypen durch einen geraden Schnitt entfernt (Abb. 29E). Die Expression von *MK55* startet unter diesen Bedingungen 16 Stunden nach dem Verlust der Fußregion (Abb. 29G und J). Vorher ist keine Expression nachweisbar (Abb. 29F und I). *MK55* ist stark in den säulenförmigen Ektodermzellen der sich regenerierenden Fußscheibe exprimiert. Dabei läuft die Expression diffus in der apikal gelegenen Zellschicht aus. Nach 36 Stunden ist die Fußregeneration abgeschlossen und die *MK55* Expression von der Fußscheibe bis zum apikalen Rand des Fußes nachweisbar (Abb. 29H und K).

Wie *MK55* ist auch *MK97* im Ektoderm der Fußregion exprimiert. Ähnlich wie bei *MK55* erstreckt sich die Expression von *MK97* von der Basalplatte bis zum apikalen Rand der Fußregion (Abb. 29C). Im Gegensatz zu der *MK55* Expression ist die *MK97* Expression bis in den basalen Bereich der Körpersäule nachweisbar. Experimente mit der Sense-RNA Probe von *MK97* zeigten keine Färbungen (Abb. 29D). Während der Fußregeneration ist in den ersten 15 Stunden nach der Entfernung des Fußes keine Expression von *MK97* nachweisbar (Abb. 29L und O). Die *MK97* Expression findet wie die Expression von *MK55* erst nach einem Zeitraum von 16 Stunden statt (Abb. 29M und P). Zu diesem Zeitpunkt ist die *MK97* Expression im Vergleich zu der *MK55* Expression schwächer. Die Expression ist auf die säulenförmigen, ektodermalen Zellen der sich neu bildenden Fußscheibe beschränkt. Ist die Regeneration der Fußregion nach 36 Stunden abgeschlossen, erstreckt sich die Expression von *MK97* erneut von der Fußscheibe bis in den basalen Rand der Körpersäule (Abb. 29N und Q).

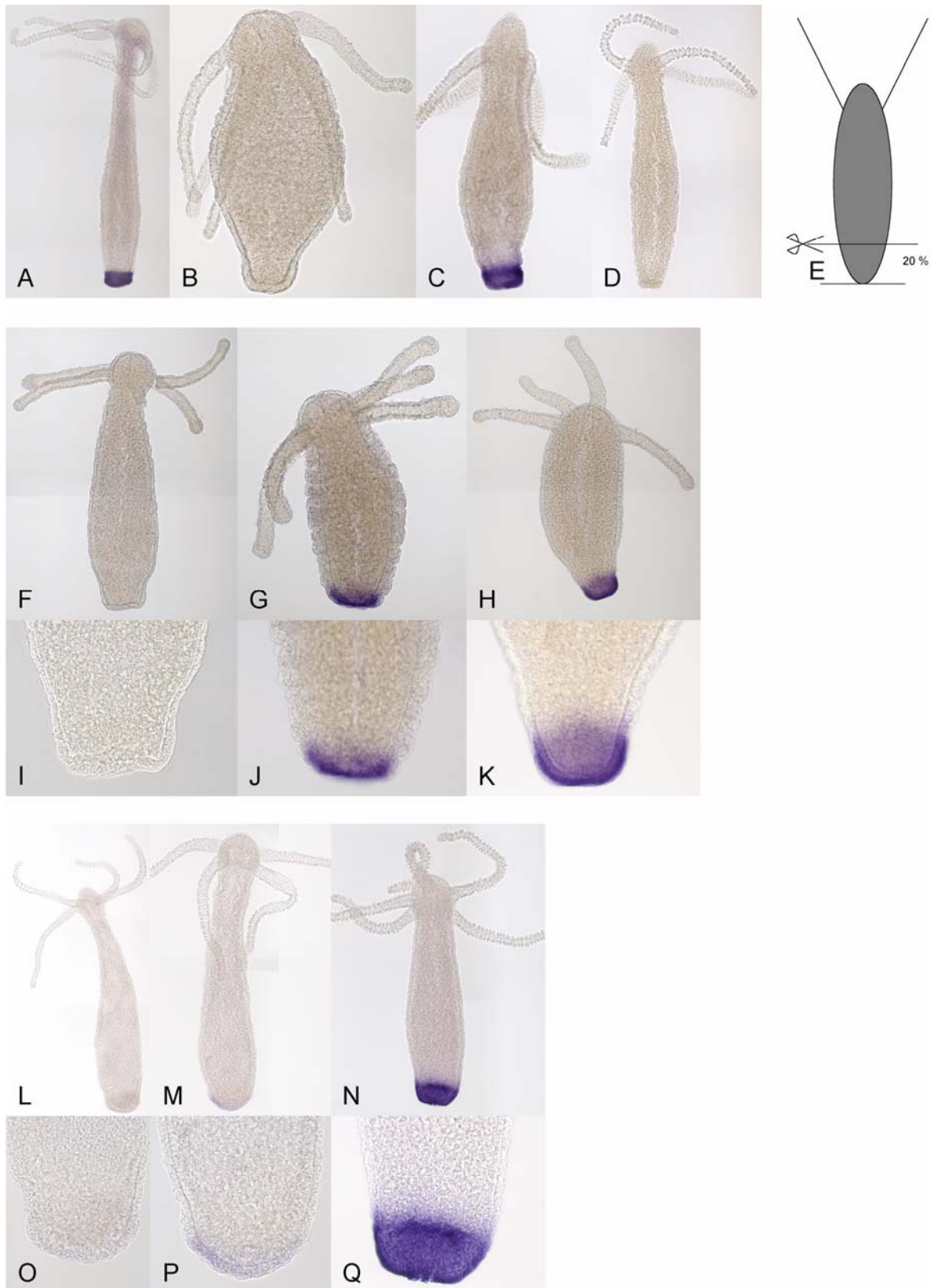


Abb. 29: Nachweis der MK55 und MK97 Expression während der Fußregeneration mittels Ganztier *in situ* Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten antisense-RNA Sonden. (A) Expressionsmuster von MK55 im adulten Polypen; (B) Kontrolle MK55 (sense-Sonde); (C) Expressionsmuster von MK97 im adulten Polypen; (D) Kontrolle MK97 (sense-Sonde); (E) Schematische Abbildung der Schnittebene für Fußregenerationsversuche; (F - K) Expressionsmuster von MK55 während der Fußregeneration; (F, I) nach 15 h; (G, J) nach 16 h, (H, K) nach 36 h; (L – Q) Expressionsmuster von MK97 während der Fußregeneration; (L, O) nach 15 h; (M, P) nach 16 h; (N, Q) nach 36 h.

2.1.2.5.2 Die Expression von *MK55* und *MK97* während der Knospung

Bis einschließlich Stadium 6 (Otto und Campbell, 1976) ist während der Knospung keine *MK55* Expression nachweisbar (Abb. 30A und B). Im Stadium 7 kommt es zu einer punktuellen Expression im Entoderm an der Knospenunterseite, direkt am Übergang zwischen Muttertier und Knospe (Abb. 30C und D). Zu einem späteren Zeitpunkt im Knospenstadium 7, breitet sich die Expression lateral aus und bildet schließlich einen Ring um die zukünftige Fußregion der Knospe (Abb. 30E und F). Kurz vor der Ablösung der Knospe in Stadium 10, umschließt die *MK55* Expression die Fußregion vollständig. Durch die vorangegangene Einschnürung der Knospe sind Knospe und Muttertier zu diesem Zeitpunkt fast vollständig von einander getrennt. Die Knospe löst sich nun vom Muttertier ab. Die *MK55* Expression verbleibt ausschließlich im Ektoderm der Fußregion der Knospe (Abb. 30G und H).

Für die *MK97* Expression gilt, dass sie bis zu Knospenstadium 6 nicht nachweisbar ist (Abb. 30I und J). Ab Stadium 7 setzt die Expression an der Unterseite der Knospe in dem an das Muttertier angrenzende ektodermalen Gewebe ein (Abb. 30K und L). Ähnlich der von *MK55* Expression in einem späten Stadium 7 umschließt auch die *MK97* Expression ringförmig das basale Ende der Knospe (nicht gezeigt). Im Knospenstadium 9 bildet die *MK97* Expression keine scharfe Grenze zwischen Fußregion und Stiel, sondern reicht diffus bis in den Stiel (Abb. 30M und N). Kurz vor der Ablösung in Knospenstadium 10 lässt sich die Expression von *MK97* nur in der Fußregion der Knospe detektieren (Abb. 30O und P).



Abb. 30: Expressionsmuster von *MK55* und *MK97* während der Knospung. Der Nachweis über die Expression von *MK55* und *MK97* wurde mittels Ganztier *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurden Digoxigenin-markierte antisense-RNA Sonden benutzt. Die Knospenstadien entsprechen den Stadien nach Otto und Campbell (Otto und Campbell, 1977). (A – H) Expression von *MK55*: (A, B) Knospenstadium 6; (C, D) Stadium 7; (E, F) spätes Stadium 7; (G, H) Stadium 10. (I – P) Expression von *MK97*: (I, J) Knospenstadium 6; (K, L) Stadium 7; (M, N) Stadium 9; (O, P) Knospenstadium 10.

2.1.3 Die cDNA *MK38*

Die cDNA *MK38* stammt aus dem Expressionsscreening einer LiCl induzierten cDNA Bank (Klenk, 1999). Exprimiert wird das Transkript ubiquitär im ganzen Polypen mit Ausnahme des Hypostoms.

2.1.3.1 Die cDNA-Sequenz von *MK38* ist unvollständig

Das 947 Nukleotide große Transkript *MK38* besitzt ein offenes Leseraster mit einer Größe von 840 Nukleotiden und kodiert für ein Peptid, das aus 280 Aminosäuren besteht (Abb. 31). Als ein mögliches Start-Codon wurden die Nukleotide an Position 107 - 109 identifiziert. Die Sequenzumgebung um das Start-Codon hat nur eine geringe Übereinstimmung mit der optimierten Initiations-Sequenz nach Kozak (vergleiche 3.1.1.1). So ist nur das Guanin an Position -3 vor dem Start-Codon, mit der optimierten Sequenz identisch. Ein Stop-Codon an Position 95, also in der 5' nicht translatierten Region vor dem Start-Codon unterstützt die Vermutung, dass das 5' Ende des Transkripts vollständig ist. Dies bekräftigt auch die Annahme, dass an dem vermutlichen Start-Codon die Initiation der Translation statt findet. Das 3' Ende des Transkripts enthält 17 Adenine. Da aber sowohl ein Stop-Codon als auch ein Polyadenylierungs-Signal fehlen, ist anzunehmen, dass es sich bei den Adeninen nicht um das poly(A)-Ende der mRNA handelt und die cDNA-Sequenz somit unvollständig ist.

1	GCAAAACGTGCAGCTGCACTCCTCCCACTATAGCTGCTGGAGGAAAAGTTGATGAGAGTG	60
1		
61	GGGGTGCTCCACAAGCTGCGGCTGCTGTTTTTATTGACCCTTG <u>GAAATG</u> TTTGATCCAGT	120
6	D I L S Q M P K D F Y E L V E S K K W Q	25
121	TGATATCTTGAGTCAAATGCCTAAAGATTTTTATGAGCTAGTTGAAAGCAAAAAATGGCA	180
26	E R K E T L E A L E K L T S N P K L E A	45
181	GGAGCGTAAAGAGACATTAGAAGCATTAGAAAACTAACATCAAATCCCAAACCTTGAGGC	240
46	G Q Y G E V C A V L K K V I T K D S N V	65
241	TGGTCAGTATGGAGAAGTATGTGCTGTTTTAAAAAAGGTGATTACAAAAGATAGTAATGT	300
66	V V V A I R A N C V T G L A K G L R K K K	85
301	TGTGGTTGTTGCTATTTCGAGCAAATTGTGTTACTGGTCTTGCTAAAGGATTAAGAAAAAA	360
86	F Q T Y S G L L I P A I L G K F K E K K K	105
361	ATTTCAAACGTATTCTGGACTTTTGATTCCAGCTATTCTTGAAAAATTAAGGAAAAAAA	420
106	L N V V I A L R D A L D A V F A T T N F	125
421	GTAAATGTAGTTATTGCATTGAGAGATGCATTAGATGCTGTTTTTGCTACGACTAACTT	480
126	T N I M E D L L A S L D N K N P Q I K E	145
481	TACTAATATAATGGAGGATCTGCTTGCATCATTGGACAATAAAAACCCACAAATTAAAGA	540
146	E T C R F I T R T C S T S T V A A F P K	165
541	GGAAACTTGCAGATTTATAACAAGAACATGCTCCACTTCTACTGTTGCAGCTTTTCCAAA	600
166	S V L K L V A P A L V L R L D D T V G S	185
601	AAGTGTAAAAATTAGTAGCTCCTGCACTAGTTCTTAGGTTAGATGATACAGTTGGTTC	660
186	V R D A A A E S L G T V M K L V G E R A	205
661	TGTTTCGTGATGCAGCAGCTGAATCACTTGGGACAGTTATGAAATTAGTTGGAGAACGTGC	720
206	M A A Y L D S I D K L K Q E K V K E Y F	225
721	AATGGCAGCCTATCTAGATTCTATTGATAAATTAAAGCAGGAAAAAGTAAAAGAATATTT	780
226	E K A V L T P S A G G G A S G N A G G E	245
781	TGAAAAGGCAGTTTTTAACACCCAGTGCTGGAGGTGGAGCTTCTGGTAATGCTGGAGGTGA	840
246	N T T T T A A A A P A A S A F S K A G P	265
841	AAACACAACAACAACTGCTGCTGCTGCACCAGCTGCATCTGCATTTTCTAAGGCAGGTCC	900
266	S K P V P K S V Q P K K K K K K	280
901	TTCTAAACCTGTGCCTAAAAGTGTACAGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	947

Abb. 31: DNA-Sequenz von MK38 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nummerierung der Nukleotide und der translatierten Aminosäuren befinden sich zu beiden Seiten. Das mögliche Start-Codon und die Übereinstimmungen mit der optimierten Kozak-Sequenz sind unterstrichen.

2.1.3.2 Die Northern Blot Analyse identifiziert für *MK38* ein Transkript der Größe 6,9 kb

Um die vollständige Größe des Transkripts *MK38* zu bestimmen, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Die Analyse wurde mit poly(A)⁺-RNA und einer radioaktiv markierten *MK38*-Sonde durchgeführt. Es wurde eine einzelne Bande mit der Größe von 6,9 kb detektiert (Abb. 32).

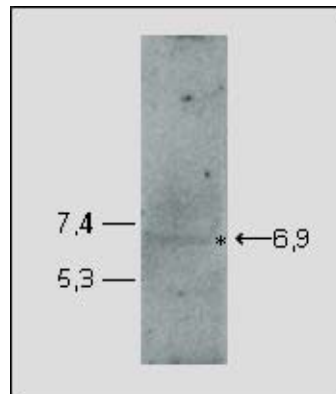


Abb. 32: Northern Blot Analyse von *MK38*. Unter stringenten Bedingungen wurde poly(A)⁺-RNA (4 µg) mit ³²P-radioaktiv markierter *MK38* Sonde hybridisiert. Die Sonde detektiert eine einzelne Bande der Größe 6,9 kb. Die Markergröße und die Bandengröße sind jeweils links bzw. rechts in kb in der Abbildung angegeben.

2.1.3.3 Das Transkript *MK38* ähnelt der TOG Domäne Mikrotubuli-assoziiierter Proteine

Die Datenbankanalyse von *MK38* erbrachte eine Sequenzähnlichkeit mit den Proteinen der MAP215/Dis1 Familie. Die Mitglieder dieser Familie binden alle *in vitro* und / oder *in vivo* an Mikrotubuli und werden daher zu den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP) gezählt. Die charakterisierten MAP215/Dis1 Proteine sind mit Ausnahme der Proteine aus Pflanzen, alle im Mikrotubuli Organisationszentrum (MTOC) lokalisiert. Das MTOC ist der Ausgangspunkt auswachsender Mikrotubuli in der Zelle, einschließlich der Spindelpolkörper in Hefe und den Centrosomen in tierischen Zellen.

Der Name MAP215/Dis1 Familie, beruht auf den beiden ersten identifizierten Mitgliedern dieser Familie, dem XMAP215 aus *Xenopus laevis* (Gard und Kirschner, 1987) und Dis1 aus *Schizosaccharomyces pombe* (Ohkura et al., 1988). Weitere charakterisierte Mitglieder sind Mor1 aus *A. thaliana* (Whittington et al., 2001), TMBP200 aus *N. tabaccum*, Stu2 aus *S. cerevisiae* (Wang und Huffacker, 1997), Alp14 aus *S. pombe* (Garcia et al., 2001; Nakaseko et al., 2001), DdCP224 aus *D. discoideum* (Graf et al., 2000; Yasuhara et al., 2002), Zyg9 aus *C. elegans* (Matthews et al., 1998), Minispindel (Mps) aus *D. melanogaster* (Cullen et al., 1999) und dem XMAP215 Homolog ch-TOG aus *H. sapiens* (Charrasse et al., 1995). In einer groß angelegten Datenbankanalyse von Genomsequenzen und expressed sequence

tag (EST) Projekten hat Gard 39 weitere mögliche Proteinsequenzen identifiziert (Gard et al., 2004).

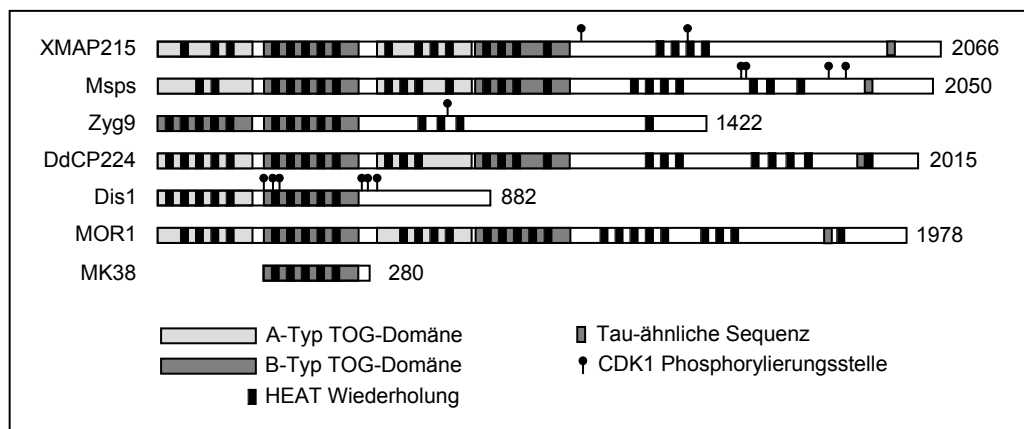


Abb. 33: TOG Domänen und deren HEAT Sequenzwiederholungen der MAPs. Schematische Darstellung von XMAP215 aus *Xenopus laevis* (Acc.-Nr CAB61894), Msps aus *D. melanogaster* (Acc.-Nr AJ249115), Zyg9 aus *C. elegans* (Acc.-Nr AF035197), DdCP224 aus *D. discoideum* (Acc.-Nr AJ012088), Dis1 aus *Schizosaccharomyces pombe* (Acc.-Nr D55635), Mor1 aus *A. thaliana* (Acc.-Nr AF367246) und MK38. Am Ende des Proteins ist die Größe in Aminosäuren angegeben.

Die Proteine der MAP215/Dis1 Familie besitzen eine gemeinsame strukturelle Organisation. Ihre Größe schwankt zwischen 800 und 2000 Aminosäuren, wobei die meisten Proteine einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren besitzen (Gard et al., 2004). Das N-terminale Ende besteht aus zwei bis vier TOG Domänen (Abb. 33). Jede dieser TOG Domänen ist etwa 280 Aminosäuren groß und kann einem Typ A bzw. Typ B zugeordnet werden. Dabei folgt die Anordnung der einzelnen Domänen dem Schema: 1A, 1B, 2A, 2B. Jede TOG Domäne enthält bis zu fünf HEAT Sequenzwiederholungen. Der Name HEAT setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der vier Proteine zusammen, in denen die Sequenzwiederholung ursprünglich gefunden wurde: **H**untingtin, **E**longationsfaktor 3 (EF3), **U**ntereinheit **A** der Proteinphosphatase 2A (PP2A) und **T**OR1 (Andrade und Bork, 1995). Die Sequenz der HEAT Wiederholungen ist schwach konserviert und besteht aus 35 bis 50 Aminosäuren. Charakteristisch sind hintereinander angeordnete α -Helices und ein konserviertes Muster an hydrophoben und geladenen Aminosäureresten. Die N-terminalen HEAT Sequenzwiederholung der einzelnen TOG Domänen besitzen jeweils eine Konsensussequenz. Im Falle der A-Typ TOG Domäne ist das $W K \Phi R \Phi$, wobei Φ eine apolare Aminosäure darstellt. Die HEAT Wiederholung der B-Typ TOG Domäne trägt die Signatur $K W K D/E R K$ (Gard et al., 2004).

Außerhalb der TOG Domäne kommen weitere HEAT Sequenzwiederholungen vereinzelt im C-terminalen Teil der MAPs vor (Neuwald und Hirano, 2000; Gard et al., 2004).

In einem Alignment mit den charakterisierten Mitgliedern der MAP215/Dis1 Familie aliniert MK38 mit der ersten B-Typ TOG Domäne der MAPs (Abb. 34). Eine Ausnahme bildet Zyg9,

das zwei B-Typ TOG Domänen, jedoch keine A-Typ Domänen enthält. In diesem Fall aliniert MK38 mit der zweiten B Typ TOG Domäne.

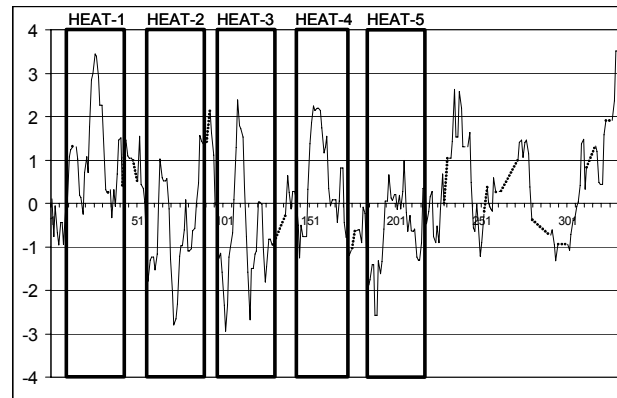
Die TOG Domäne von MK38 besteht aus fünf HEAT Sequenzwiederholungen, wie dies auch der Fall bei der ersten B-Typ TOG Domäne der MAP, bzw. auch der zweiten der Domänen von Zyg9 der Fall ist. Die erste HEAT Sequenzwiederholung von MK38 besitzt die typische Konsensussequenzsignatur der B-Typ TOG Domänen in der ersten HEAT Wiederholung mit einer Glutaminsäure anstelle einer Asparaginsäure. Die Ähnlichkeit der HEAT Wiederholung von MK38 zu den HEAT Wiederholung der Vertretern liegt zwischen 43,7% und 62,5%, die der Invertebraten zwischen 28,1% und 62,5% und die der Protisten zwischen 30,3% und 50% (Tabelle 12 im Anhang 7.3).

Für HEAT Sequenzwiederholungen ist die Anordnung hydrophober Aminosäuren charakteristisch (Andrade und Bork, 1995). Daher wurde für die TOG Domäne von MK38 und der alinierten TOG Domäne dreier Mitgliedern der MAP215/Dis1 Familie die Hydrophilie nach Kyte und Doolittle (1982) mit dem Programm Peptidestructure (HUSAR, DKFZ, Heidelberg) bestimmt (Abb. 35). Bei der grafische Darstellung der Hydrophilie wurde ähnlich dem Alignment (Abb. 34) fehlende Aminosäuren durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Es zeigte sich, dass in den HEAT Sequenzwiederholungen von MK38 und den Proteinen der MAP215/Dis1 Familie hydrophile und hydrophobe Aminosäuren ähnlich verteilt sind. Dies ist ein weiterer Beweis, dass die Sequenz eine TOG Domäne besitzt.

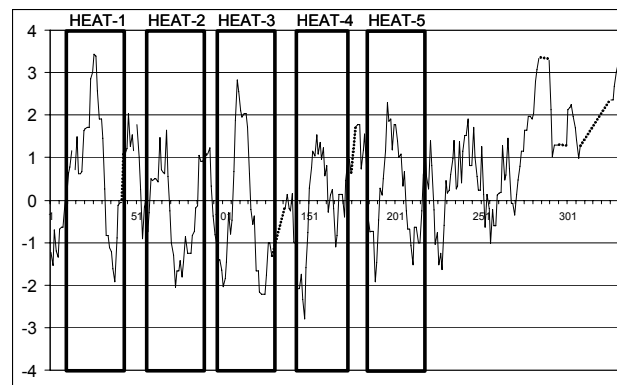
Nächste Seite

Abb. 34: Alignment der TOG-Domäne von MK38 mit der der Proteine der MAP215/Dis1 Familie. Sequenzähnlichkeiten von MK38 mit den Proteinen der MAP215/Dis1 Familie sind fett hervorgehoben. Die einzelnen HEAT Sequenzwiederholungen sind eingerahmt. Die Signatursequenz der B-Typ TOG-Domäne ist unterstrichen. Hydrophobe Aminosäuren sind grau unterlegt.

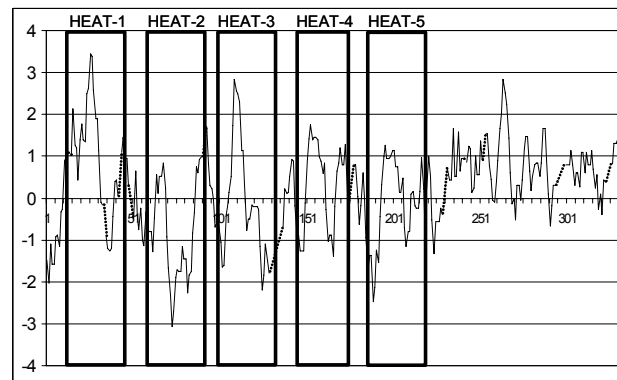
[illegible]



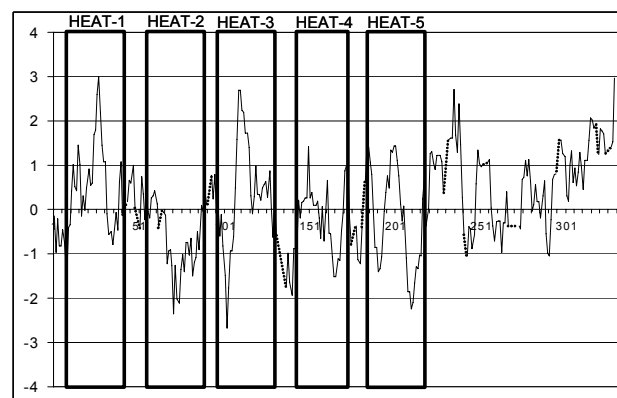
MK38



Zyg9



XMAP215



MOR1

Abb. 35: Hydrophilieplot der B-Typ TOG-Domäne von MK38 und den Mitgliedern der MAP215/Dis1 Familie. Die Bestimmung der Hydrophilie erfolgte nach Kyte und Doolittle (1982) und wurde gemäß dem Alignment (Abb. 34) aufgetragen. Lücken im Alignment wurden mit gestrichelten Linien dargestellt. Die einzelnen HEAT Sequenzwiederholungen sind eingerahmt.

In nahezu allen Sequenzen der MAP215/Dis1 Familie wurden mögliche Phosphorylierungsstellen für die Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1) mit dem Motiv S/T PX K/R nachgewiesen. Diese sind hauptsächlich im C-terminalen Teil vorhanden (Gard et al., 2004). Bisher wurde aber nur für Dis1 und XMAP215 gezeigt, dass auch eine Phosphorylierung statt findet (Nabeshima et al., 1995; Gard und Kirschner, 1987). Eine mögliche Phosphorylierungsstelle für CDK1 fehlt der bekannten Sequenz von MK38.

ch-TOG besitzt an seinem C-terminalen Ende eine 18 Aminosäure große Sequenz, die zu 44% identisch mit der Tau Sequenzwiederholung aus MAP2 und MAP4 ist (Charrasse et al., 1998). Die Tau Sequenz aus MAP2 und MAP4 liegt in 3 bis 5 Kopienzahlen vor und ist in der Tubulin/Mikrotubuli Bindungsdomäne enthalten (Chapin und Bulinski, 1991; Wang et al., 1988; Chapin and Bulinski, 1992). Bei ch-TOG hingegen liegt die Tau-ähnliche Sequenz nur in einer Kopie vor. Tau-ähnliche Sequenzen wurden auch in anderen Proteinen der MAP215/Dis1 Familie nachgewiesen (Gard et al., 2004). In der bekannten Peptidsequenz von MK38 konnte keine Tau-ähnliche Sequenz identifiziert werden.

Das Transkript von MK38 ist nicht vollständig. Einen Hinweis darauf gibt, wie in 2.1.3.1 ausgeführt, die Nukleotidsequenz, der sowohl ein Stop-Codon als auch ein Polyadenylierungs-Signal fehlt. Die Überprüfung der Transkriptgröße von MK38 bewies, dass es sich bei MK38 nicht um das vollständige Transkript handelt. Möglicherweise kam es bei der cDNA Synthese zur Bindung des poly(T)-Primeres an eine A reiche Stelle innerhalb der MK38 mRNA. Im Alignment aliniert das Lysin reiche C-terminale Ende von MK38 mit Lysin reichen Stellen von XMAP215, ch-TOG und Zyg9 (Abb.36).

XMAP215	570	Lys	Gly	Lys	Lys	Ala	575
	1705	AAG	GGC	AAA	AAG	GCA	1719
ch-TOG	579	Lys	Asn	Lys	Lys	Gly	583
	1740	AAG	AAC	AAG	AAA	GGA	1754
Zyg9	581	Asp	Lys	Lys	Lys	Lys	585
	1741	GAT	AAG	AAG	AAG	AAA	1755
MK38	276	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	280
	932	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	946

Abb. 36: Vergleich der Nukleotidsequenz der Lysin-reichen Regionen von XMAP215, ch-TOG, Zyg9 und MK38.

2.1.3.4 ***MK38* wird von entodermalen Zellen mit Ausnahme von Zellen des Hypostoms exprimiert**

Der Nachweis der *MK38* Expression erfolgte mittels nichtradioaktiver Ganztier *in situ* Hybridisierung. *MK38* wird im Fuß, der Gastralregion, dem Kopf ohne Hypostom und den Tentakeln in den entodermalen Zellen exprimiert. Besonders stark ist die Expression in der Fußregion. Oberhalb des Tentakelkranzes ist keine Expression nachweisbar (Abb. 37). Bemerkenswert ist die stärkere Expression von *MK38* in Geweben wie die Fußregion und den Tentakeln, da hier keine Zellproliferation mehr statt findet (Holstein et al., 1991). Eine Erklärung hierfür könnte eine erhöhte Stabilität der Transkripte im Fuß und den Tentakeln sein. Im Hypostom ist keine Expression nachweisbar. Die Zellen des Hypostoms proliferieren zwar, besitzen aber im Vergleich zu Zellen der Gastralregion eine niedrigere Proliferationsrate (Holstein et al., 1991). Möglicherweise ist hier auf Grund eines rascheren Abbau der mRNA keine Expression von *MK38* nachweisbar.



Abb. 37: Expressionsmuster von *MK38*. Das Expressionsmuster von *MK38* wurde mittels Ganztier *in situ* Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten antisense-RNA Sonde nachgewiesen (Klenk, 1999).

2.2 Anpassung der Elektroporationsbedingungen zur Durchführung der RNAi Methode bei *Hydra vulgaris*

Zur Funktionsanalyse der untersuchten Gene sollte die RNAi Methode, die bereits erfolgreich bei *Hydra magnipapillata* angewandt wurde (Lohmann et al., 1999), auch bei *Hydra vulgaris* (Zürich) etabliert werden. Bei der RNAi Methode kann durch endogene doppelsträngige RNA (dsRNA) das homologe Gen eines Organismus temporär inaktiviert werden. Eine solche Inaktivierung ähnelt dem Phänotyp einer Knock-out Mutante.

Wie Lohmann in seinem Protokoll beschreibt, sollte bei *Hydra vulgaris* dsRNA mittels Elektroporation in intakte Polypen transfiziert werden. Dazu verwendete er 60 Tiere in einer Küvette mit einer Spaltbreite von 0,4 cm. Das bei der Elektroporation verwendete elektrische Feld hatte eine Stärke von 0,95 kV/cm bei einer Kapazität von 25 Mikrofarad (μF) und einer Pulsdauer von 7 bis 9 Millisekunden (msec).

2.2.1 Die Optimierung der Elektroporationseffizienz bei *Hydra vulgaris*

Um eine effektive Methode zur Elektroporation von *Hydra vulgaris* zu entwickeln, wurden vier verschiedene Elektroporationsgeräte getestet. In mehreren Versuchsreihen wurden das Elektroporationsmedium, die Feldstärke und die Art des beim Puls erzeugten elektrischen Feldes variiert. Als Grundlage diente das Protokoll von Lohmann et al. (1999).

2.2.1.1 Die getesteten Elektroporationsgeräte

Die Methode der Elektroporation geht auf die Elektropulsation von Neumann und Rosenheck (1972) zurück. Dabei wird mittels eines pulsartigen, elektrischen Feldes eine Veränderung des Membranpotentials der Zelle bewirkt. So entstehen Poren mit einem Durchmesser von 20 - 120 nm in der Zellmembran (Neumann et al., 1999), die sich wenige Sekunden nach dem Puls wieder schließen (Ho und Mittal, 1996). Während dieser Zeit gelangen geladene Teilchen aktiv aufgrund des elektrischen Feldes durch Elektrophorese (Neumann et al., 1996), bzw. ungeladene Teilchen passiv durch Diffusion (Neumann et al., 1998) in die Zelle. Die Art des elektrischen Feldes hat Auswirkung auf die Aufnahmeeffizienz und die Zellmortalität. Häufig wird das elektrische Feld durch das Aufladen eines Kondensators und das ungebremste Entladen über die Zellsuspension erzeugt. Dabei entsteht ein Impuls mit steilem Anstieg und exponentiellen Abfall (Baum et al., 1994). Zwei der getesteten

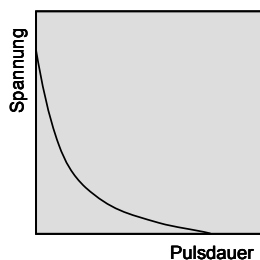
Elektroporationsgeräte erzeugten einen exponentiell abfallenden Puls: der Gen Pulser II der Firma BioRad und im Einzelpuls Modus der Easyject Plus der Firma Peqlab (Abb. 38).

Einen modifizierten Puls mit einem exponentiellen Abfall erzeugt der Multiporator der Firma Eppendorf. Der so genannte Soft Pulse wird alle 5 Mikrosekunden neu reguliert, so dass nach der Pulslänge τ noch 37% der ursprünglichen Spannung des Pulses vorhanden sind.

Dies verspricht eine hohe Reproduzierbarkeit eines Pulses. Des Weiteren hatte das Gerät die Möglichkeit, Pulse gleicher Art im Abstand von einer Minute auf die Probe zu verabreichen (Abb. 38).

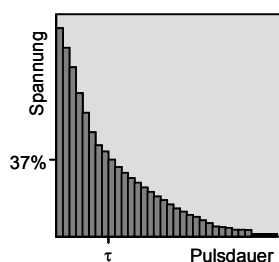
Der Easyject Plus der Firma Peqlab hat neben dem Einzelpuls Modus auch die Möglichkeit der OptiPulseTM Technik. Dabei werden zwei Pulse erzeugt. Der erste Puls mit einer sehr hohen Spannung und nur sehr kurzer Länge soll der Erzeugung von Poren in der Zellwand dienen. Der zweite Puls besteht bei einer niedrigen Spannung lange Zeit fort und dient dem Transport geladener Teilchen in die Zelle (Abb. 38).

Eine sanftere Methode verspricht die Erzeugung eines Rechteck-Impulses. Hierbei bleibt durch Verzögerung des Abfalls, das elektrische Feldes während der Pulsdauer nahezu konstant (Hänze et al., 1998). Der Elektroporations-Impulsgeber EPI 2500 von Dr. Fischer erzeugt einen solchen Puls.

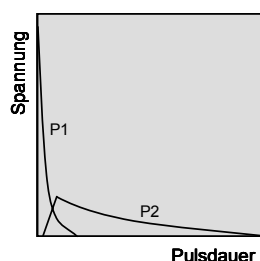
Exponentiell abfallender Puls

EasyJet PLUS Peqlab (Einzelpuls)		
Modus für	hohe Spannungen	niedrige Spannungen
Spannung [V]	100 – 3500	20 – 450
Kapazität [μ F]	0,5 und 25	150 – 3000
Pulslänge [msek]	0,01 – 7000	0,01 – 7000

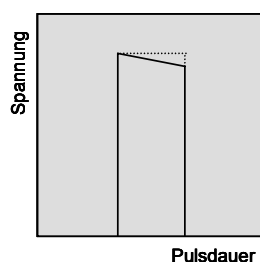
Gen Pulser II BioRad	
Spannung [V]	200 – 3000
Kapazität [μ F]	10, 25 und 50
Pulslänge [msek]	0,05 – 10

Soft Pulse

Multiporator Eppendorf	
Anzahl der Pulse	1 – 99
Spannung [V]	20 – 1200
Kapazität [μ F]	10, 25 und 50
Pulslänge τ [msek]	0,015 – 0,5

OptiPulse™

EasyJet PLUS Peqlab (OptiPulse™)		
	Plus 1 (P1)	Puls 2 (P2)
Spannung [V]	100 – 3500	20 – 450
Kapazität [μ F]	0,5 und 25	0,5 und 25
Pulslänge [msek]	0,01 – 7000	

Rechteck Impuls

Elektroporations-Impulsgeber EPI 2500 Dr. Fischer		
Modus	1 (Kapazität fest)	2 (Kapazität variabel)
Spannung [V]	0 – 2400	0 – 600
Kapazität [μ F]	100	0 – 1200
Pulslänge [msek]	0 – 100	

Abb. 38: Vergleich der getesteten Elektroporatoren und der erzeugten elektrischen Pulse.
 Angegeben sind jeweils die erzeugten elektrischen Impulse und die Einstellmöglichkeiten der Geräte.

2.2.1.2 Der Aufbau der Elektroporationsversuche

Zur Optimierung der Elektroporation von *Hydra vulgaris* wurden Versuche mit unterschiedlichsten Bedingungen durchgeführt. Dabei blieb der Versuchsaufbau jedoch stets erhalten (Abb. 39). Zur Elektroporation wurden adulte Polypen ohne Anzeichen für eine Knospung benutzt. Diese wurden eine halbe Stunde vor Versuch auf 4°C gekühlt. Vor der Elektroporation wurden die Polypen dreimal mit eiskalten Elektroporationsmedium gewaschen und in die gekühlte Küvette überführt. Nach dem Pulsen wurden die überlebenden Polypen für je 24 Stunden bei 4°C zunächst in 20% dann in 10% Dissoziationsmedium inkubiert. Anschließend konnten die Tiere wieder im Kulturreaum in Hydramedium gehalten werden. Nach mündlichen Angaben von Lohmann sollte eine erfolgreiche Elektroporation daran zu erkennen sein, dass die Tiere „mitgenommen“ aussehen. Diese Tiere zeigten kurze Tentakelstummel sowie Verletzungen im Gastralregion. Tiere die nach der Elektroporation unverwundet waren, sollten als nicht elektroporiert entfernt werden. Intakte Tiere und Gewebefragmente wurden entfernt.

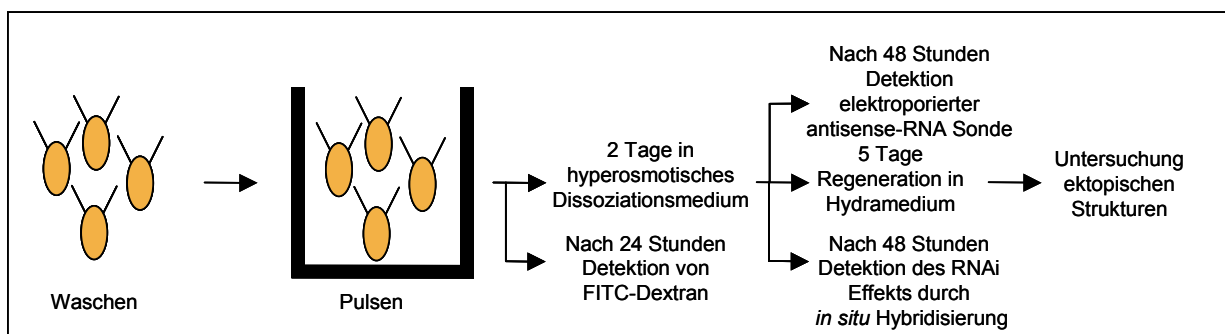


Abb. 39: Versuchsanordnung zur Elektroporation von *Hydra vulgaris*. Beschreibung siehe Text.

Zunächst wurden mit den einzelnen Geräten nur Elektroporationen in Elektroporationsmedien durchgeführt, um Bedingungen zu finden, unter denen einerseits eine ausreichende Menge an Polypen elektroporiert wurden, andererseits noch genug überlebten.

Elektroporationsbedingungen die eine sichtliche Auswirkung auf die Zellen des Polypen hatten, wurden auf die Aufnahme von Fluoresceinisothiocyanat-markiertes Dextran (FITC-Dextran) mit einer Größe von 10 kDa getestet. Der Nachweis der Aufnahme von FITC-Dextran erfolgte 24 Stunden nach Elektroporation. Vereinzelt wurden Elektroporationsversuche mit Digoxigenin-markierter antisense-RNA durchgeführt. Nach zwei Tagen Regeneration wurden die Polypen anschließend fixiert. Zum Nachweis der Aufnahme der antisense-RNA wurde eine verkürzte Ganztier *in situ* Hybridisierung ohne Hybridisierungsschritte durchgeführt.

2.2.1.3 Die Variationen der Elektroporationsbedingungen

Bei einem Plattenkondensator ist die elektrische Feldstärke E proportional zur angelegten Spannung U . Gleichzeitig ist die Feldstärke jedoch umgekehrt proportional zum Abstand der Platten ($E \sim 1/d$). Daraus ergibt sich für das elektrische Feld $E=U/d$. Für das von Lohmann eingesetzte elektrische Feld ergibt sich daher eine Spannung von $U=380$ V.

Zur Bestimmung geeigneter Elektroporationsbedingungen für die RNAi bei *Hydra vulgaris* wurden je nach Einstellmöglichkeiten der einzelnen Elektroporationsgeräte die Art und Anzahl der elektrischen Impulse und die Feldstärke variiert (Tabelle 10). Als Elektroporationsmedium wurde DEPC behandeltes Wasser, Hydramedium und 0,25 x PBS getestet.

Tabelle 10: Variation der Elektroporationsbedingungen der einzelnen Geräte. Zu beachten ist, dass am Multiporator nicht die Pulsdauer sondern nur τ , also die Pulslänge bis 37% der ursprünglichen Spannung erreicht ist, eingestellt werden kann.

Elektroporationsgeräte	Spannung [V]	Kapazität [μ F]	Pulsdauer [msec]	Besonderheit
Versuche mit einem exponentiell abfallenden Puls				
Gene Pulser II BioRad	380	25	ca. 7	-
Easyject Plus Peqlab	350, 400 und 450	0,5 und 25	ca. 7	Einzelpuls
Versuche mit einem Soft Pulse				
Multiporator Eppendorf	200, 300 und 400	10, 25 und 50	τ ca. 7	Pulswiederholungen: 1, 3 und 5
Versuche mit einem OptiPulse™				
Easyject Plus Peqlab	Puls1: 350, 400 und 450	0,5	ca. 7	-
	Puls2: 50, 60 und 150	0,5	ca. 7	-
Versuche mit einem Rechteck Puls				
Elektroporations- Impulsgeber EPI 2500 Dr. Fischer	250, 300, 350, 400 und 450	100 und 1200	3, 5 und 7	-

Der Gene Pulser II der Firma BioRad ist das Nachfolge Modell des von Lohmann (1999) benutzten Elektroporators. Das Gerät wird für die Elektroporation prokaryotischer Zellen verwendet. Er erzeugt einen elektrischen Puls, der exponentiell abfällt (Abb. 38).

Der Gene Pulser II wurden unter identischen Bedingungen verwendet wie von Lohmann (1999) beschrieben, und entsprechend wurde eine Spannung von 380 V, 25 μ F und 200 Ω bei einer durchschnittlichen Pulsdauer von 7 ms eingestellt. Alle Elektroporationen wurden in Küvetten mit einer Spaltgröße von 0,4 cm durchgeführt. Als Medium dienten 200 μ l Hydramedium bzw. 0,25 x PBS. In keinem der Medien konnte unter diesen Bedingungen eine sichtbaren Auswirkungen auf die Polypen nachgewiesen werden. Versuche mit FITC-Dextran erbrachten keine Färbung. Es wurden keine weiteren Variationen durchgeführt, die vom Lohmannschen Protokoll abwichen.

Im Einzelpuls Modus erzeugt der Easyject PLUS der Firma Peqlab ebenfalls wie der Gen Pulser II einen exponentiell abfallenden Puls (Abb. 38). Bei den Versuchen mit einem Einzelpuls wurden Kombinationen von unterschiedlicher Spannungen und einer Kapazität von 0,5 μF oder 25 μF getestet (Tabelle 10). Als Elektroporationsmedium diente DEPC behandeltes Reinstwasser, 0,25 x PBS oder Hydramedium. Getestet wurden Küvetten mit einem Spalt von 0,2 cm und 0,4 cm. Zur Überprüfung der Elektroporationseffizienz wurde neben FITC-Dextran, auch Digoxigenin-markierte Antisense RNA und dsRNA elektroporiert. Elektroporation die bei 400 V, 25 μF und einer Pulsdauer von ca. 7 msec die mit einer Küvette mit einem Spalt von 0,4 cm durchgeführt wurden, zeigten einen schwachen Elektroporationseffekt. Verluste durch die Elektroporation lagen zwischen 10% und 15% der Tiere. Eine niedrigere Spannung hatte keine Effekte auf die Polypen. Höhere Spannungen führten drei Tage nach Elektroporation zu einer Mortalitätsrate von 100%.

Im Modus für eine niedrige Spannung konnte das von Lohmann et al., (1999) erzeugte elektrische Feld von 0,95 kV/cm durch das Einstellen von einer Spannung von 380 V erhalten werden. Dabei musste allerdings eine Kapazität von mindestens 150 μF verwendet werden. Keine der so elektroporierten *Hydra vulgaris* Polypen überlebte die folgenden zwei Tage.

Der Multiporator der Firma Eppendorf besitzt die Soft Pulse Technologie und erzeugt einen modifizierten exponentiell abfallenden Puls, der alle fünf Mikrosekunden neu reguliert wird (Abb. 38). Zusätzlich besitzt er die Option mehrere gleiche Soft Pulse im Abstand von einer Minute zu erzeugen. Auf Grund der Tatsache, dass das Gerät nur für eine begrenzte Zeit zur Verfügung stand, und die Auswertung der Versuche jeweils mehrere Tage in Anspruch nahm (Abb. 39), wurde eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Versuchen durchgeführt.

Getestet wurden Pulse mit einer Spannung von 200 V, 300 V und 400 V sowie einer Kapazität von 25 μF . Dazu wurden Küvetten mit einem Spalt von 0,4 cm benutzt. Da nur wenige Tiere zur Verfügung standen wurden ein bis zwei Polypen in 50 μl 0,25 x PBS elektroporiert. Nur die Elektroporation bei 200 V hatten keine sichtbaren Auswirkungen auf die Polypen. Ab 300 V und drei Wiederholungen wurde das Ektoderm entlang der Körperachse beschädigt, was dem von Lohmann et al., (1999) beschriebenen Phänotyp entspricht. Trotz der offensichtlich schädigenden Wirkung der Mehrfachpulse konnte keine Aufnahme von FITC-Dextran in die elektroporierten Polypen nachgewiesen werden.

Der OptiPulse™ des Easyject PLUS der Firma Peqlab erzeugt nach einem ersten sehr starken aber kurzen elektrischen Puls, einen zweiten, dafür schwächeren aber längeren Puls (Abb. 38). Für den ersten Puls wurde eine Spannung von 350 V, 400 V und 450 V und eine Kapazität von 0,5 μF oder 25 μF gewählt. Bei dem zweiten Impuls betrug die Spannung 50 V der 60 V und 150 V. Die Kapazität des ersten und zweiten Impulses waren gleich und konnten für den zweiten Impuls nicht geändert werden. Als Elektroporationsmedium wurde

DEPC behandeltes Reinstwasser, 0,25 x PBS und Hydramedium getestet. Die Elektroporation wurde in Küvetten mit einem Spalt von 0,2 cm und 0,4 cm durchgeführt. Wie auch beim Einzelpuls zeigte eine Spannung von 400 V bei 25 μ F in einer Küvette mit einem Spalt von 0,4 cm die größte Wirkung. Die Erhöhung der Spannung des zweiten Puls von 50 V auf 60 V hatte keine Auswirkung auf die Elektroporationseffizienz. Bei Elektroporationen von 450 V wurden die Polypen zu sehr beschädigt, wohingegen niedrigere Spannungen keine Auswirkungen hatten. Unter den oben genannten Bedingungen war es nicht möglich, bei Elektroporationen mit FITC-Dextran oder Digoxigenin-markierter antisense RNA die Aufnahme der Moleküle nachzuweisen. Versuche mit dsRNA zeigten keine signifikanten Ergebnisse.

Alle bisher verwendeten Geräte erzeugten einen exponentiell abfallenden Puls. Der Elektroporations-Impulsgeber EPI 2500 (Dr. L. Fischer, Heidelberg) hingegen erzeugt einen Rechteckpuls, dessen Feldstärke während der eingestellten Pulslänge nahezu konstant bleibt (Abb. 38). Getestet wurden die Variationen der Spannung von 250 V, 300 V, 350 V, 400 V und 450 V bei einer Kapazität von 100 μ F und 1200 μ F und einer Pulslänge von 7 msec. Es wurden pro Ansatz 60 Tiere in Elektroporationsküvetten mit einer Spaltbreite von 0,4 cm benutzt. Dabei zeigte sich, dass Elektroporationen bei einer Spannung von 350 V, einer Kapazität von 100 μ F und einer Pulslänge von 7 msec am effektivsten waren. Die Polypen zeigten die charakteristischen Verletzungen, die Lohmann et al. (1999) beschreiben, bei einer Überlebensrate von 50% - 74%. FITC-Dextran wurde unter diesen Bedingungen nicht in den elektroporierten Polypen nachgewiesen. Eine Erhöhung der Kapazität bei gleichzeitiger Senkung der Pulslänge auf 3 msec bei einer Spannung von 350 V führte zu einem Rückgang der Überlebensrate auf 30%.

2.2.1.4 Die Elektroporationseffekte von *K10-7* dsRNA auf *Hydra vulgaris*

Zum Nachweis von möglichen RNAi-Effekten, die durch die Elektroporation von dsRNA bei *Hydra vulgaris* induziert werden, wurde für alle weiteren Versuche der Elektroporations-Impulsgeber EPI 2500 (Dr. L. Fischer, Heidelberg) benutzt. Pro Ansatz wurden 60 Polypen in einer Küvette von 0,4 mm Spaltbreite elektroporiert. Als Elektroporationsmedium dienten 200 μ l Hydramedium die 10 μ g dsRNA enthielt. Die Bedingungen für den Puls waren wie in 3.2.1.4 mit einer Spannung von 350 V, einer Kapazität von 100 μ F und einer Pulsdauer von 7 msec.

In einem einzelnen Versuch wurde der Abbau von *K10-7* mRNA untersucht. Nach der Elektroporation von 60 Polypen mit *K10-7* dsRNA wurden die überlebenden Tiere nach 48 Stunden in einer *in situ* Hybridisierung auf *K10-7* Transkript untersucht (Abb. 39). Von den 60 eingesetzten Polypen überlebten sowohl bei der Elektroporation mit *K10-7* dsRNA, als auch

in der Kontrollelektroporation jeweils 27 Tiere. Es zeigten sich keine signifikante Unterschiede bei der Färbedauer oder Farbtintensität zwischen den Kontrollpolypen und den mit *K10-7* dsRNA elektroporierten Polypen. Somit ist anzunehmen, dass in etwa die gleiche Menge an *K10-7* Transkript vorhanden ist und die Elektroporation mit dsRNA keinen Effekt hatte.

Tabelle11: Effekte sieben Tagen nach Elektroporation mit dsRNA mit dem Elektroporations-Impulsgeber EPI 2500 (Dr. L. Fischer). Bedingungen: Spannung, 350 V; Kapazität, 100 µF; Pulsdauer, 7 msec; 60 Tier/200 µl Hydramedium; 10 µg dsRNA

Elektroporierte dsRNA	<i>K10-7</i>					<i>HvRab11</i>	Kontrolle			
Ansatz	1	2	3	4	5	1	1	2	3	4
Überlebende	31	37	35	29	33	24	36	33	29	29
Tiere mit ektopischen Fußstrukturen	8	13	8	14	15	8	8	4	15	19
Tiere mit ektopischen Fuß- und Kopfstrukturen	1	1	-	2	-	1	1	-	1	-
Tiere mit ektopischen Kopfstrukturen	2	4	2	3	1	1	3	1	4	1
Tiere mit ektopischen Körperstrukturen insgesamt	11	18	10	19	16	10	12	5	20	20

Polypen, die unter den oben genannten Bedingungen elektroporiert wurden, entwickelten nach ca. 60 Stunden ektopische Körperstrukturen. In fünf unabhängigen Versuchsreihen wurden je 60 Polypen mit *K10-7* dsRNA elektroporiert (Tabelle 11). Sieben Tage nach Elektroporation mit *K10-7* dsRNA besaßen von den insgesamt 165 überlebenden Polypen 35% ektopische Füße und 7% ektopische Tentakel. Sowohl ektopische Füße und Tentakel hatten 4% der Polypen. Bei Kontrollelektroporationen ohne dsRNA überlebten aus vier unabhängigen Versuchsreihen insgesamt 154 Polypen. Davon zeigten 40% ektopische Füße und 7% ektopische Tentakel. 1,8% hatten sowohl ektopische Füße und Tentakel. Als zweite Kontrolle wurde eine Elektroporation mit dsRNA des *HvRab11* Transkripts aus *Hydra vulgaris* durchgeführt. Von den 24 überlebenden Polypen hatten 33% ektopische Füße und 4% ektopische Tentakel. Beide ektopischen Strukturen formte sich bei 4% der Polypen.

Es ist anzunehmen, dass die Bildung ektopischer Körperstrukturen nach Elektroporation von *Hydra vulgaris* nicht auf einen RNAi-Effekt zurück zuführen ist. Dafür sprechen beide Kontrollansätze. Sowohl bei Elektroporationen mit *HvRab11* dsRNA, als auch Kontrollelektroporationen ohne dsRNA wurde in etwa dieselbe Ausbildung ektopischer Strukturen nachgewiesen.

2.2.1.5 Zusammenfassung der Elektroporationseffekte

Mit keinem der in dieser Arbeit getesteten Elektroporationsgeräte konnte trotz breit angelegter Variationen der Bedingungen, eine Aufnahme von FITC-Dextran in die Zelle

nachgewiesen werden. Auch die Versuche mit Digoxigenin-markierter antisense-RNA zeigten keine signifikante Effekte.

Auch die Wahl unterschiedlicher Elektroporationsmedien (0,25 x PBS, Hydramedium und DEPC behandeltes Wasser) zeigten keine Unterschiede bei den Elektroporationseffekten.

Auffällig bei den Elektroporationsversuchen mit dsRNA sind das Auftreten von ektopischen Kopf- und/oder Fußstrukturen. Diese Versuche wurden mit dem Elektroporations-Impulsgeber EPI 2500 von Dr. L. Fischer unter den Bedingungen, Spannung 350 V, Kapazität von 100 µF und einer Pulslänge von 7 msec, durchgeführt. Dabei bildeten insgesamt 44% der mit *K10-7* dsRNA, 41% der mit *HvRab11* elektroporierte Hydren und 37% der Kontrolltiere ektopische Körperstrukturen aus. Zwischen Polypen die mit dsRNA elektroporiert wurden und Kontrolltieren konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die durchgeführten Elektroporationsversuche lassen die Schlussfolgerung zu, dass *Hydra vulgaris* (Zürich) entweder für eine Elektroporation nicht zugänglich ist oder elektroporierte Substanzen schnellstmöglich aus der Zelle entfernt werden. Zusätzlich verbietet ein hoher Prozentsatz von Tieren mit ektopischen Strukturen nach Elektroporation weitere Experimente mit dem Ziel eventuelle Morphogenese-steuernde Gene mittels RNAi zu charakterisieren.

3 Diskussion

Neben dem einfachen Körperbau macht auch das hohe Regenerationsvermögen den Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris* zu einem interessanten Untersuchungsobjekt der Entwicklungsbiologie. Der diploblastische Mehrzeller besitzt eine schlauchförmige Gastralregion, an deren Enden sich zwei differenzierte Strukturen, die Kopf- und die Fußregion befinden.

Die Fußregion gliedert sich in eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Stielregion und die Fußscheibe. Dem Fuß von *Hydra* kommen verschiedene Aufgaben zu. Als basales Ende des Polypen ermöglicht er die Anhaftung an das Substrat. Dazu sondern spezielle Drüsenzellen der Basalscheibe ein viskoses Sekret ab.

Zellproliferation findet vor allem in der Körpersäule statt (Holstein et al., 1991). Auf Grund dieser Proliferation und des ständigen Verlustes von Zellen an den Körperenden kommt es zu einem kontinuierlichen Fluss von Gewebe in die Extremitäten. Die ektodermalen Epithelzellen transdifferenzieren im Bereich der Tentakel zu nematocystentragenden Batteriezellen, bzw. in der Fußregion zu Sekret sezernierenden Fußzellen der Basalscheibe.

3.1 Das Sequenzieren der Transkripte ohne fußspezifischem Expressionsmuster führte zur Identifikation von Haushalts-Genen

Als Ausgangsmaterial für diese Arbeit dienten zwei Expressionsscreenings einer LiCl induzierten cDNA-Bank, die von Annette Bieller (1997) für ihre Dissertation sowie Markus Klenk (1999) im Zuge seiner Staatsexamensarbeit durchgeführt wurden.

Aus diesen Banken wurden insgesamt 34 Transkripte zur Sequenzierung ausgewählt. Drei der Transkripte sind in der Fußregion exprimiert: *MK55*, *MK97* und *K10-7*, sie wurden im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert. Die cDNA *MK38* wird im gesamten Polypen mit Ausnahme des Hypostoms exprimiert und wurde ebenfalls näher charakterisiert.

Von den 30 verbleibenden Transkripten zeigten 11 cDNAs keine Übereinstimmung mit bekannten Nukleotidsequenzen. Die restlichen 20 Transkripte wiesen Sequenzähnlichkeit zu Haushalts-Genen auf. Die 31 Transkripte können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Ganztierexpressionsmuster und regional verteilte Expressionsmuster. Bei der Gruppe mit einem Ganztierexpressionsmuster ist anzunehmen, dass die Genprodukte der Transkripte an Prozessen beteiligt sind, die in allen Zellarten des Organismus gleichermaßen vorkommen. Die Transkripte mit regional verteilten Expressionsmustern zeigten alle

Sequenzähnlichkeit zu Haushalts-Genen. Bei den Expressionsmustern dieser Transkripte waren meist einzelne Regionen von der Expression ausgeschlossen.

3.2 *MK38* kodiert ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit mit Proliferationsmarkern der MAP215/Dis1 Familie wurde *MK38* näher untersucht.

Im N-terminalen Ende dieser Proteinfamilie sind zwei bis vier TOG Domänen enthalten (Gard et al., 2004). Eine TOG Domäne besteht aus etwa 280 Aminosäuren und enthält bis zu fünf HEAT Sequenzwiederholungen (Ohkura et al., 2001). In den bisher charakterisierten MAP215/Dis1 Proteinen wurden zwei verschiedene TOG Domänen Typen (A und B) identifiziert (Gard et al., 2004). Mit Ausnahme von Zyg9 aus *C. elegans*, das nur B-Typ Domänen besitzt, folgt einer A-Typ immer eine B-Typ Domäne. Das Transkript *MK38* hat Sequenzähnlichkeit mit der ersten B-Typ TOG Domäne der bekannten MAP215/Dis Proteine, bzw. mit der zweiten B-Typ Domäne von Zyg9 (Abb. 35).

Die Sequenz des Transkripts *MK38* ist nicht vollständig. In einer Northern Blot Analyse wurde eine einzelne Bande mit der Größe von 6,9 kb identifiziert. Die cDNA von *MK38* ist jedoch nur 840 Nukleotide groß. Wahrscheinlich die Bindung des poly(T)-Primers an eine Adenin-reichen Sequenz innerhalb der mRNA während der cDNA-Synthese zur Verkürzung der Sequenz.

Aufgrund der Northern Blot Analyse ist anzunehmen, dass das *MK38* Protein eine ähnliche Größe wie Msps aus *Drosophila melanogaster* oder XMAP215 aus *Xenopus laevis* hat. Proteine dieser Größe besitzen vier TOG Domänen, wobei die Domänen des A- und B-Typ alternierend angeordnet sind (Abb. 35). Daher kann angenommen werden, dass auch *MK38* vier TOG Domänen enthält. Da *MK38* jedoch ähnlich wie Zyg9 mit einer B-Typ Domäne beginnt, ist fraglich, ob *MK38* auch A-Typ Domänen enthält, und ob diese in einer symmetrischen Reihenfolge angeordnet sind.

Eine spezifische Funktion der TOG Domäne ist bis jetzt noch nicht bekannt. Gard spekuliert, dass die hohe Konservierung der TOG Domäne, darauf hinweist, dass eine Sequenzdivergenz durch einen funktionellen Druck limitiert ist (Gard et al., 2004).

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit ist anzunehmen, dass die Funktion von *MK38*, der der Proteine der MAP215/Dis1 Familie ähnelt. Alle Mitglieder, mit Ausnahme des aus Pflanzen isolierten Vertreters MOR1, sind im Mikrotubuli assoziierten Organisationszentrum (MTOC) lokalisiert, einschließlich der Spindelpolkkörper bei Hefe und der Centrosomen in Tieren. Des Weiteren binden alle bisher charakterisierten Mitglieder, *in vitro* und/oder *in vivo* an Mikrotubuli (Gard et al., 2004).

Eine weitere Möglichkeit ist, dass MK38 eine ähnliche Funktion wie MOR1 hat, das in der MAP215/Dis1 Familie eine Sonderstellung besitzt. Im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern führt der Verlust der MOR1 Funktion bei Pflanzen nicht zu Defekten während der Mitose oder der Zellteilung (Twell et al., 2002). MOR1 unterstützt den Zusammenbau oder die Aufrechterhaltung der dynamischen Instabilität der Mikrotubuli (Twell et al., 2002).

Das Expressionsmuster von MK38 ist nicht einfach zu interpretieren. *MK38* wird von allen entodermalen Zellen mit Ausnahme von Zellen im Hypostom exprimiert. Auch die Zellen des Hypostoms proliferieren, wenn auch im Vergleich zur Gastralregion mit einer geringeren Rate (Holstein et al., 1991). Daher ist auch von diesen Zellen eine *MK38* Expression zu erwarten. Eine Erklärung für das Fehlen von MK38 wäre, dass Vorhandensein eines zweiten MAP215/Dis1 Proteins. Bisher wurden nur in der Spalthefe zwei MAP215/Dis1 Proteine, Dis1 und Alp14, isoliert (Nabeshima et al., 1995; Garcia et al., 2001; Nakaseko et al., 2001). Beide Gene arbeiten überlappend aber nicht identisch. Keines der beiden Gene ist für die Zelle zum Überleben notwendig (Garcia et al., 2001; Nakaseko et al., 2001; Ohkura et al., 1988). Der Verlust eines der beiden Gene resultiert in einem mitotischen Defekt und in verlangsamtem Wachstum. Erst der Verlust beider Gene ist letal (Garcia et al., 2001; Nakaseko et al., 2001). Die Überexpression von Dis1 kann die Auswirkungen in *alp14* Mutationen unterdrücken. Umgekehrt führt jedoch die Überexpression von Alp14 nur zu einer teilweisen Rettung der Dis1 Mutanten (Garcia et al., 2001; Nakaseko et al., 2001). Auch bei *Hydra* ist eine ähnliche Konstellation vorstellbar. Ein verwandtes Protein könnte in ektodermalen Zellen sowie in den Zellen des Hypostoms die Aufgabe von MK38 übernehmen, und die Proliferationsrate modulieren.

Im Gegensatz zu der fehlenden Expression von *MK38* in proliferierendem Gewebe steht die Expression in den Tentakeln, in denen keine Proliferation stattfindet. Eine erhöhte Stabilität der mRNA könnte der Grund für den Nachweis in diesem Gewebe sein.

Voraussetzung für funktionelle Studien wäre eine vollständige Klärung der Nukleotidsequenz von MK38. Diese könnte mittels eines Screenings einer cDNA-Bank, mit den bekannten Abschnitten von *MK38* als Sonde, isoliert werden. Mit dem aufgereinigten Protein könnten *in vitro* überprüft werden, ob MK38 an Mikrotubuli bindet. Eine solche Bindung wurde für nahezu alle charakterisierten MAP215/Dis1 Proteinen nachgewiesen (Gard et al., 2004). Des Weiteren könnte untersucht werden, ob MK38 den Zusammenbau bzw. das Wachstum von Mikrotubuli fördert. Dies wurde unter anderem für XMAP215 nachgewiesen (Gard und Kirschner, 1987). Mit Antikörpern gegen MK38 könnte das Protein während der Zellteilung lokalisiert werden, was Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins während der Mitose geben könnte. Da die Expression von *MK38* nicht auf eine signifikante Funktion während der Fußentwicklung schließen lässt, wurde auf derartige Experimente in dieser Arbeit verzichtet.

3.3 *MK55* und *MK97* zeigen Sequenzähnlichkeit mit Proteinen der Familie Rhamnose-bindender Lektine

MK55 und *MK97* werden im intakten Fuß in den ektodermalen Epithelzellen exprimiert. Die Expression ist in der Fußscheibe bis zum apikalen Rand des Fußes nachweisbar. Dabei bildet die Expression von *MK55* eine scharfe Grenze zu dem nicht exprimierenden distal gelegenen Gewebe der Körpersäule, während die Expression von *MK97* diffus ausläuft. Während der Fußbildung startet die Expression von *MK55* und *MK97* in ektodermalen Zellen des zukünftigen Fußes, kurz vor deren Differenzierung zu fußspezifischen Drüsenzellen. Während der Fußbildung bei der Knospung beginnt die Expression von *MK55* und *MK97* keilförmig an der basalen Seite der Knospe im Stadium 7 (Abb. 30C und K). Bereits im Knospenstadium 8 hat sich die Expression lateral ausgebreitet und umfasst nun die entstehende Fußregion der Knospe.

Für beide Transkripte erbrachte die Datenbankanalyse eine Sequenzähnlichkeit mit den Proteinen der Familie Rhamnose-bindender Lektine (RBL). Die Mitglieder dieser Familie besitzen eine bis mehrere Kohlenhydrat Erkennungsdomänen (CRD) (Tanteno et al., 2002). Bei *MK97* konnten vier CRDs nachgewiesen werden. *MK55* enthält vier komplette und den C-terminalen Teil einer fünften CRD.

Das Start-Codon konnte für keines der beiden Transkripte identifiziert werden. In einer Northern Blot Analyse wurde für *MK97* eine einzelne Bande mit einer Größe von 1,4 kb ermittelt. Da die Größe der cDNA 1258 bp beträgt, ist anzunehmen, dass am 5'-Ende des Transkripts nur wenige Nukleotide nicht gelesen wurden.

Für *MK55* wurde in der Northern Blot Analyse zwei Banden mit einer Größe 2,2 kb und 2,4 kb detektiert. Aufgrund dieser Analyse ist davon auszugehen, dass es zwei Isoformen von *MK55* gibt, die rechnerisch neben den vier identifizierten noch drei bzw. vier unbekannte CRDs enthalten könnten. Bisher wurden nur RBLs identifiziert, die höchstens drei CRDs besitzen. Die in *Hydra vulgaris* gefundenen beiden RBLs sind mit vier CRDs bei *MK97* und sieben bzw. acht CRDs bei *MK55* die größten Proteine dieser Familie.

Bisher wurden RBL Sequenzen aus Seeigeln und den Eiern von Wels (Hosono et al., 1999), Forelle (Tateno et al., 2001), Saibling (Tateno et al., 2002) und Ponyfisch (Okamoto et al., 2005) isoliert und charakterisiert. Dabei wurden bei Forelle drei und bei Saibling zwei verschiedene RBLs gefunden. *Hydra vulgaris* besitzt mindestens drei RBLs, *MK97* und die zwei Isoformen von *MK55*. Die Analyse einer Datenbank von *Hydra* und *Hydractinia* EST-Sequenzen (www.hydrabase.org) lässt die Vermutung zu, dass bei *Hydra magnipapillata* eine große Gruppe von mindestens 43 unterschiedlichen RBLs vorhanden ist. Diese 43 unterschiedlichen RBLs setzten sich aus den Sequenzen der 13 Gruppen, den *MK55*- und *MK97*-ähnliche RBLs und 28 individuellen Sequenzen zusammen. Zur weiteren

Charakterisierung müsste von allen RBLs die vollständige Sequenz bzw. Größe mittels RACE PCR und Northern Blot Analyse bestimmt werden. Interessant wäre auch die Frage ob die Expression der unterschiedlichen RBLs in jedem Fall auf die Fußregion beschränkt ist.

Lektine sind Zucker-bindende Proteine die in Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten nachgewiesen wurden. Die Funktion von L-Rhamnose bindenden Lektinen ist noch unbekannt, es wird aber angenommen, dass sie an einer Vielzahl biologischer Funktionen beteiligt sind, wie der Regulation des Kohlenhydratmetabolismus, der Vernetzung von Kohlenhydrat-reichen Proteinen in der Hülle des befruchteten Eies, der Prävention von Polyspermie oder bakteriziden Effekten (Lam und Ng, 2002). Über die Funktion von MK55 und MK97 kann daher nur spekuliert werden. Möglicherweise haben sie einen antibakteriellen Effekt ähnlich den STLs.

Tests für die drei STLs (STL1, STL2 und STL3) zeigten dass sie Lipopolysaccharide (LPS) und Lipoteichonsäure (LTA), welche den Hauptbestandteilen der äußeren Membran von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien bilden, binden (Tateno et al., 2002). In Bindungsstudien mit Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, wurden jedoch nur *Escherichia coli* K12 und *Bacillus subtilis* von STLs agglutiniert. Auch die Expression von STL1 lässt auf eine Wirkung bei der Abwehr von Pathogenen schließen. STL1 ist im adulten Tier unter anderem in Magen, Kiemen und Milz, also Organen, die entweder Pathogenen ausgesetzt sind oder eine Funktion bei der Immunabwehr haben, exprimiert (Tateno et al., 2002).

Es gibt mehrere Hinweise, dass Hydra eine Immunabwehr hat. So zeigten Kasahara und Bosch (2003), dass ein Zusammenhang zwischen Nervennetz und der Bakterienabwehr bestehen. Wird die Anzahl der Nervenzellen bei *Hydra* gesenkt, so kommt es zu einer erhöhten bakteriellen Aktivität im Epithel. Das Nervennetz hilft gleichermaßen Gram-positive und Gram-negative Bakterien abzuwehren, wobei im unteren Teil des Polypen eine leicht erhöhte Aktivität gegen Gram-negative Bakterien festgestellt wurde. Darüber hinaus gibt es auch Anzeichen, dass bei anderen Invertebraten und sogar Vertebraten eine Verbindung zwischen Nervensystem und Immunsystem besteht (Salzet et al., 2000; Duveaux-Miret et al., 1992; Salzet, 2001).

Da der Fuß den Kontakt zwischen Polypen und dem Substrat herstellt, ist besonders das basale Ende Pathogenen ausgesetzt. Es ist daher vorstellbar, dass das Sekret, das von fußspezifischen Zellen abgegeben wird, auch antiseptisch wirkt. In fußspezifischen Drüsenzellen wurde eine Peroxidase identifiziert (Hoffmeister-Ullerich et al., 2002), die möglicherweise an Abwehrreaktionen gegen Erreger beteiligt ist.

RBLs wie SUEL und die Proteine der STLs werden in der Zelle in kortikalen Vesikeln gespeichert und in die extrazelluläre Matrix abgegeben (Ozeki et al., 1991; Tateno et al.,

2001). Es ist anzunehmen, dass ab Knospenstadium 8 auch MK55 und MK97 in Vesikeln gespeichert und nach der Differenzierung der Zellen zu Fußscheibenzellen in das Sekret abgegeben werden.

Für eine Funktionsanalyse von MK55 und MK97 wäre die Aufreinigung der Proteine hilfreich. Mit den Proteinen könnte überprüft werden, ob auch MK55 und MK97 Gram-positive oder Gram-negative Bakterien agglutiniert. Mit Antikörper gegen die RBLs aus *Hydra vulgaris* könnte die Verteilung der Proteine im Gewebe untersucht werden.

3.4 K10-7 ist möglicherweise an der Zelldifferenzierung beteiligt

Das fußspezifische Gen *K10-7* ist durch EGF-ähnliche Domänen gekennzeichnet. Die Sequenz des Transkripts ist komplett und besitzt sowohl ein Start- als auch ein Stop-Codon. Die Sequenzanalyse erbrachte Ähnlichkeit mit der EGF-ähnlichen Domäne der Proteine aus den Familien der Tenascine und Teneurine.

In *Hydra vulgaris* wird *K10-7* im intakten Fuß exprimiert. Dabei erstreckt sich die Expression von der Basalplatte bis zum apikalen Rand des Fußes. In Fußregenerationsexperimenten, bei denen das untere Fünftel des Polypen entfernt wurde, startet die Expression von *K10-7* nach 18 Stunden, kurz bevor epitheliale Zellen zu Sekret bildenden Zellen differenzieren. Ähnlich der Fußregeneration ist die Expression bei der Fußbildung während der Knospung kurz vor der Differenzierung von fußspezifischen Drüsenzellen nachweisbar. Die frühe Expression könnte ein Hinweis darauf sein, dass *K10-7* bei der Differenzierung dieser Zellen eine Rolle spielt.

Um die Funktion von *K10-7* bei der Fußbildung experimentell zu belegen, wurden mit Hilfe von LiCl ektopische Füße induziert und auf *K10-7* Expression hin untersucht. Noch bevor ektopisches Fußgewebe sichtbar wird, ist die Expression flecken-, ring- und kreisförmig nachweisbar. Wahrscheinlich ist auch hier *K10-7* an der Differenzierung von epithelialen Zellen zu Fußzellen beteiligt. Jungpolypen, d.h. Polypen die sich frisch vom Muttertier abgelöst haben, zeigen bei der LiCl Behandlung ein ähnliches Expressionsmuster wie adulte Tiere. Dies beweist, dass die nachgewiesene Expression nicht auf ein autarkes „Weiterlaufen“ des Fußbildungsprogramms einer durch LiCl unterdrückten Knospung zurückzuführen ist (Hassel und Berkin, 1990).

Um Aussagen über eine mögliche Funktion von *K10-7* bei der Fußbildung machen zu können, war eine Zuordnung der ermittelten Aminosäuresequenzen zu bekannten Proteinen nötig. Da Sequenzähnlichkeiten sowohl zur Familie der Tenascine als auch zur Familie der Teneurine bestehen wurden beide in die Analysen einbezogen.

Anhand des Alignments wurde für K10-7 eine EGF-ähnliche Domäne identifiziert, die sechs EGF-ähnlichen Motive enthält. Die Übereinstimmungen der Sequenz mit den entsprechenden EGF-ähnlichen Motiven der Tenascine bzw. Teneurine liegt zwischen 34,3% und 10,8% für Tenascine und zwischen 40% und 8,1% für Teneurine.

Es kann davon ausgegangen werden, dass EGF-ähnliche Motive eine ähnliche Tertiärstruktur wie der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ausbilden (Zanuttin et al., 2004). Für die korrekte Faltung des EGFs als auch der EGF-ähnlichen Motive ist die Ausbildung von Disulfidbrücken wichtig. Essentiell ist die Ausbildung der zweiten und dritten Disulfidbrücke zwischen Cys-2/Cys-4 und Cys-5/Cys-6 (Alewood et al., 2005). Fehlt eine der beiden Brücken so ist das EGF Molekül nahezu linear und zeigt kaum Aktivität. Dagegen ist die Ausbildung der ersten Disulfidbrücke weniger essentiell (Barnham et al., 1998). Das Fehlen der Brücke hat ausschließlich Auswirkung auf den Bereich um die fehlende Brücke. Die Tertiärstruktur des Moleküls und damit die Funktion bleiben erhalten (Abb. 10).

Keines der in K10-7 gefundenen EGF-ähnlichen Motive besitzt alle sechs EGF-typischen konservierten Cysteine. Die EGF-ähnliche Domäne von K10-7 besitzt ein Motiv das möglicherweise eine EGF-ähnliche Tertiärstruktur einnehmen kann. EGF(1) fehlt zwar die erste Disulfidbrücke (Cys-1/Cys-3), es kann aber die für die Proteinstruktur wichtigen zweite und dritte Brücke (Cys-2/Cys-4 und Cys-5/Cys-6) ausbilden.

Auch EGF(4) bildet zwei Disulfidbrücken aus. Dabei handelt es sich aber um die erste und zweite Disulfidbrücke. Daher ist anzunehmen, dass keine EGF-ähnliche Proteinstruktur eingenommen wird.

EGF(5) und EGF(6) bilden jeweils nur eine und EGF(2) und EGF(3) keine Disulfidbrücke aus. Überdies ist EGF(2) mit nur 23 Aminosäuren ein stark verkürztes Motiv.

EGF-ähnliche Domänen kommen in vielen Proteinen vor. Sie wurden z.B. allein schon in 300 menschlichen extrazellulären Proteinen gefunden (Letunic et al., 2004). Dabei bestehen die Domänen einiger der Proteine aus einer Vielzahl hintereinander angeordneter EGF-ähnlicher Motive wie z.B. das Notch Proteine mit 36 Motiven (Artavarius-Tsakonas et al., 1995). Andere Proteine wie die Prostaglandin H Synthase-1 enthalten nur ein einziges EGF-ähnliches Motiv (Picot et al., 1994).

EGF-ähnliche Motive vermitteln Protein-Protein Interaktionen (Stenflo et al., 2000). Dabei reichen meist ein oder zwei Motive aus. Bei der Interaktion von Notch mit Delta sind dies die Motive EGF(11) und EGF(12) (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Die Urokinase interagiert sogar nur mit einem einzigen EGF-ähnlichen Motiv mit dem Rezeptor (Blasi et al., 1984). Die EGF(1) von K10-7 kann also ausreichend sein um eine Protein-Protein Interaktion zu vermitteln

Eine Besonderheit der EGF-ähnlichen Domäne der Teneurine ist, dass den Motiven EGF(2) und EGF(5) jeweils das Cys-3 fehlt. Dadurch können die beiden EGF-ähnlichen Motive die

erste Disulfidbrücke nicht ausbilden. Dennoch sollten sie eine EGF-ähnliche Tertiärstruktur einnehmen können. Es gibt Hinweise, dass die Proteine der Teneurin Familie dimerisieren (Oohashi et al., 1999; Fascetti und Baumgartner, 2002; Feng et al., 2002). Dies erfolgt höchstwahrscheinlich über die ungepaarten Cysteine von EGF(2) und EGF(5) (Feng et al. 2002). Die EGF-ähnliche Domäne von K10-7 besitzt sieben ungepaarte Cysteine. Es wäre möglich, dass über diese Aminosäuren analog den Teneurinen eine Di- oder Multimerisierung stattfindet.

Über die Funktion der EGF-ähnlichen Domäne der Tenascine und Teneurine ist bisher wenig bekannt. Swindle et al. (2001) konnten zeigen, dass einzelne klonierte EGF-ähnliche Motive von TN-C mit einer geringen Affinität an EGF-Rezeptoren (EGFR) binden. Möglicherweise besitzt die EGF-ähnliche Domäne auch eine mitogene Wirkung, wie dies für die EGF-ähnlichen Motive des Tenascins nachgewiesen wurde (Spring et al., 1989).

Tenascine werden auch als Zelladhäsionsmodulatoren bezeichnet (Jones und Jones, 2000). Im Gegensatz zu anderen Proteinen der extrazellulären Matrix wirken Tenascine nicht nur adhäsiv, sondern auch antiadhäsiv, und helfen so Grenzen in sich entwickelnden oder regenerierenden Geweben zu bilden. Pesheva und Probstmeister (2000) konnten zeigen, dass ein Teil der EGF-ähnlichen Domäne verantwortlich für die antiadhäsiven Wirkung von TN-R bei Neuronen ist. Ob die Konservierung der EGF-ähnlichen Domäne von K10-7 ausreicht um analoge Funktionen zu übernehmen, wie sie für die EGF-ähnliche Domäne der Tenascine beschrieben wurden, bleibt noch nachzuweisen.

Die Expression von *K10-7* während der Knospung ist möglicherweise mit der Expression von *Kringelchen*, einem Rezeptor für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor gekoppelt. Im Knospenstadium 4 wird *kringelchen* von ektodermale Zellen ringförmig an der Knospenbasis exprimiert (Sudhop et al., 2004). Nach der Ablösung der Knospe ist die Expression ringförmig in Zellen um die Ablösestelle nachweisbar. Innerhalb weniger Stunden wird der Ring der exprimierenden Zellen immer kleiner, bis er schließlich verschwunden ist. Untersuchungen der Koexpression von *kringelchen* und *K10-7* zeigten, dass in Knospenstadium 7, dem Startpunkt der *K10-7* Expression, beide Gene überlappend an der Knospenbasis exprimiert werden. In Stadium 8 kommt es zu einer Abgrenzung der Expressionsdomänen von *kringelchen* und *K10-7* gegeneinander. Zu diesem Zeitpunkt wird *kringelchen* nur noch von ektodermalen Zellen des Muttertiers, und *K10-7* wird ausschließlich von Zellen der Knospenbasis exprimiert.

Es sind verschiedene biologische Zusammenhänge bekannt, in deren Rahmen Fibroblastenwachstumsfaktoren Einfluss auf Tenascine bzw. Teneurine nehmen. Suzuki et al. (2002) zeigten, dass durch die Injektion des Fibroblasten-Wachstumsfaktors FGF1 in den Hypothalamus der Ratte die Expression verschiedener Tenascin C Isoformen induziert wird. Beim Hühnchen wurde gezeigt, dass während der Federknospenentwicklung in der Haut die

Tenascin Expression durch FGF induziert wird (Rouzankina et al., 2004). Außerdem gibt es Hinweise, dass die Teneurin 2 Expression in Hühnchen während der Entwicklung der Gliedmaßen und der Somitenbildung durch FGF8 reguliert ist (Tucker et al., 2001). Somit ist die Induktion der K10-7 Expression durch Kringelchen vorstellbar.

Im Gesamtgefüge der Fußbildung könnte K10-7 an der Transdifferenzierung der ektodermalen Zellen beteiligt sein. Dieser Vorgang umfasst mehrere Phasen eines morphogenetischen Prozesses. Epidermale Zellen werden im Zuge des normalen Gewebeflusses aus dem Gastralraum in Richtung basales Ende verschoben. Dabei verändern die Zellen bereits im Stiel ihre Form. Sie flachen ab und enthalten, im Vergleich zu Zellen im Gastralraum, weniger Granula. Noch sind die Zellen nicht terminal differenziert, was Transplantationsexperimente aus unterschiedlichen Schichten der Stielregion belegen (Kobayakawa und Kodama, 2002). Erst wenn die Zelle den Transdifferenzierungspunkt, der oberhalb der Fußscheibe liegt, passieren, differenzieren sie endgültig. Dabei machen die Epithelzellen eine letzte drastische Veränderung ihrer Form und Funktion durch. Ektodermale Epithelzellen transdifferenzieren zu Basalscheibenzellen, und erfahren somit die terminale Differenzierung zu fußspezifische Zellen.

Eine Schlüsselrolle bei der Fußzelldifferenzierung könnte dem Mikroumfeld der Zellen zukommen. So wird spekuliert, dass zunächst die Metalloproteinasen FRAM-1, HMMP und HMP2 durch proteolytische Aktivität entscheidend das Mikroumfeld modulieren und so eine Differenzierung der epithelialen Zellen induzieren (Kupfermüller et al., 1999; Leontovich et al., 2000; Yan et al., 2000). Am terminalen Schritt der Fußzelldifferenzierung könnte K10-7 beteiligt sein, dass durch adhäsive oder antiadhäsive Wirkung ein weiteres mal das Mikroumfeld der Zellen umgestaltet.

3.5 Die Etablierung der RNAi-Methode bei *Hydra vulgaris* (Zürich)

Im zweiten Teil der Arbeit sollte mittels der RNAi-Methode eine Funktionsanalyse der charakterisierten Transkripte an *Hydra vulgaris* durchgeführt werden. Dazu sollten ganze Polypen mit dsRNA elektroporiert werden. In folgenden Regenerationsversuchen sollte dann anhand von morphologischen Veränderungen, Rückschlüsse auf die Funktion des untersuchten Gens gezogen werden.

Bei der Elektroporation wird durch einen Puls ein elektrisches Feld aufgebaut, das eine Veränderung des Membranpotentials der Zelle bewirkt (Neumann und Rosenheck, 1972). Dabei entstehen in der Zellwand Poren mit einem Durchmesser von 20 - 120 nm, die sich nach wenigen Sekunden wieder schließen (Neumann et al., 1999; Ho und Mittal, 1996). Bevor sich die Poren wieder schließen, können ungeladene Teilchen passiv durch Diffusion

(Neumann, et al., 1998) und geladene Teilchen aktiv durch Elektrophorese (Neumann, et al., 1996) ins Zellinnere gelangen. Die Dauer und Stärke des elektrischen Feldes wirken sich auf die Zellmortalität aus.

Als Grundlage zur Elektroporation von *Hydra vulgaris*, diente ein Protokoll von Lohmann et al. (1999), das bereits erfolgreich bei *Hydra magnipapillata* angewendet wurde. Lohmann verwendete den BioRad Gene Pulser, der einen Rechteck-Impuls erzeugt.

Um geeigneten Bedingungen zur Elektroporation von *Hydra vulgaris* zu finden, wurden vier verschiedene Elektroporationsgeräte getestet, die jeweils unterschiedliche elektrische Pulse erzeugen konnten.

Als Elektroporationsmedium wurde Wasser und zwei schwache Salzlösungen (Hydramedium und 0,25 x PBS) getestet. Die Untersuchungen zeigten, dass die niedrigen Salzkonzentrationen keine signifikanten Auswirkungen auf den Elektroporationseffekt hatten. Zur Kontrolle der Elektroporationseffizienz wurden Versuche mit Fluoresceinisothiocyanat-markiertem (FITC-) Dextran mit einem Molekulargewicht von 10 kDa durchgeführt.

Mit den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen konnte jedoch keine Aufnahme von FITC-Dextran in Hydren nachgewiesen werden.

Ein weiteres Nachweisverfahren über die Aufnahme von Makromolekülen in Hydren waren Elektroporationen mit Digoxigenin-markierter antisense-RNA. Mit einer *in situ* Hybridisierung konnte jedoch keine Aufnahme der RNA-Sonde nachgewiesen werden. Möglicherweise wurden während der Elektroporation RNasen freigesetzt, die die RNA-Sonden abgebaut haben bevor diese durch Hybridisierung mit der sense-RNA in der Zellen vor dem Abbau geschützt waren.

Der Elektroporations-Impulsgeber EPI 2500 (Dr. Fischer, Heidelberg) ist das einzige getestete Gerät, das ähnlich dem von Lohmann et al., (1999) benutzten Gene Pulser einen Rechteck-Impuls erzeugen kann. Daher wurden mit diesem Gerät auch Versuche mit dsRNA durchgeführt. Mit diesem Gerät wurden zwei unterschiedliche RNAi-Versuche zur Analyse der Funktion von *K10-7* durchgeführt.

Zum Nachweis eines Abbaus des *K10-7* Transkriptes durch dsRNA wurde eine *in situ* Hybridisierung zwei Tage nach Elektroporation von *Hydra vulgaris* Polypen durchgeführt. Dabei konnten bei mit dsRNA elektroporierten Polypen keine Unterschiede bezüglich der Färbedauer oder der Farbintensität im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden.

Wurden Polypen nach Elektroporation über einen längeren Zeitraum beobachtet, so bildeten sich ektopische Tentakel und/oder Füße. In fünf unabhängigen Versuchsreihen wurden insgesamt 300 Polypen mit *K10-7* dsRNA elektroporiert. Nach sieben Tagen lebten noch 165 Polypen. Davon zeigten 44% ektopische Körperstrukturen. In Kontrollversuchen wurden insgesamt 240 Polypen elektroporiert von denen nach sieben Tagen noch 154 Tiere am Leben waren. Insgesamt 37% der überlebenden Kontrolltiere bildeten ektopische

Körperstrukturen aus. In einem zweiten Kontrollversuch wurden 60 Hydren mit *HvRab11* dsRNA elektroporiert. *HvRab11* ist während der Knospenbildung und Regeneration aktiv (Schinko, 2002). Von den 24 überlebenden Polypen bildeten 41% ektopische Körperstrukturen aus.

Sowohl in Elektroporationsversuchen mit dsRNA als auch in Kontrollexperimenten konnte keine signifikanten Unterschiede bei der Ausbildung ektopischer Strukturen nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Ausbildung ektopischer Strukturen auf die Elektroporationsbedingungen zurückzuführen ist. Aufgrund von Verletzungen durch die Elektroporation könnte es zur lokalen Erhöhung bzw. Erniedrigung des Positionswertes des Gewebes kommen. Eine solche örtliche Veränderung hätte die Bildung einer Kopf- bzw. Fußstruktur zur Folge.

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass unter den getesteten Bedingungen *Hydra vulgaris* für Elektroporation nicht zugänglich ist. Entweder waren die Bedingungen nicht geeignet, um die Zellen im ausreichenden Maße für fremde Moleküle zugänglich zu machen oder die Bedingungen waren so gewählt, dass die Zellen geschädigt wurden, abstarben und schließlich abgestoßen wurden. Eine zweite Möglichkeit könnte sein, dass zwar elektroporierte Substanzen aufgenommen wurden, dann jedoch entweder schnell aus der Zellen entfernt oder, im Falle von RNA, abgebaut wurden.

Aus der Literatur sind Fälle bekannt, in denen manipulative Effekte nicht bei verwandten *Hydra*-Arten herbeigeführt werden können. So ist die eine Polaritätsumkehr durch Oligomycin im Zuge der Kopfregeneration bei *Hydra littoralis*, aber nicht bei *Hydra vulgaris* zu beobachten (Hornbruch und Wolpert, 1975). Ebenso konnte der Fuß-induzierende Effekt von Lithiumchlorid nur bei *Hydra vulgaris* nachgewiesen werden, nicht aber bei *Hydra magnipapillata*; *wt 105*, *sf1* oder bei *Hydra viridissima* (Hassel et al., 1993). Die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Untersuchungen zeigen, dass die Bedingungen für eine erfolgreiche Elektroporation von *Hydra magnipapillata* nicht auf *Hydra vulgaris* übertragbar sind.

3.6 Ausblicke

In dieser Arbeit wurden drei Transkripte untersucht, die in der Fußregion von *Hydra vulgaris* exprimiert sind. Die Charakterisierung bezüglich der Expressionsmuster sowie die Analyse der Aminosäuresequenzen zur Einordnung in die jeweiligen Proteinfamilien, können die Grundlage für weiterführende Untersuchungen bilden.

Obwohl das Mikrotubuli assoziierte Protein MK38 offensichtlich nicht an Musterbildungsprozessen beteiligt ist, wäre es interessant eine mögliche Rolle bei der Zellteilung nachzuweisen. Nach Identifizierung der gesamten Sequenz von *MK38* könnte

mittels rekombinantem Protein die Auswirkung von MK38 auf Mikrotubuli in *in vitro* Tests untersucht werden. Auch die Lokalisierung von MK38 während der Mitose Stadien kann Aufschluss über dessen Funktion geben.

Von großem Interesse ist die Rolle der Rhamnose-bindenden Lektine MK55 und MK97 bei der Immunabwehr. Hierbei interessiert die Lokalisierung der Proteine in der Zelle. Agglutinierungsstudien mit Bakterien könnten zeigen, ob *Hydra*-Lektine ähnliche Fähigkeiten besitzt wie STL. Weiterhin wäre die Größe der RBL Familie im Genom von *Hydra vulgaris* zu bestimmen. Sind hier genauso viele Mitglieder zu erwarten wie sie bei *Hydra magnipapillata* nachgewiesen wurden?

Das durch seine EGF-ähnlichen Domänen gekennzeichnete Protein K10-7, ist wahrscheinlich an der Transdifferenzierung fußspezifischer Zellen beteiligt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, ob durch Inkubation mit rekombinantem K10-7 Protein ektopische Fußstrukturen induziert werden können. Die Charakterisierung des K10-7 Rezeptors und seine Inhibierung könnte bei der Funktionsanalyse von K10-7 hilfreich sein. Die mögliche Induktion der Expression von *K10-7* durch Kringelchen ist ein Aspekt, dessen Klärung Aufschluss über grundlegende Mechanismen bei der Etablierung von Grenzen im Gewebe von *Hydra* geben kann.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit der Cnidaria-Art *Hydra vulgaris* (P. Tardent, Zürich, Schweiz) durchgeführt.

4.1.2 Chemikalien

Agarose	SeaKem
BM Purple	Roche
Euparal	Roth
Fast Red Tabletten	Roche
FITC-Dextran FD-10S	Sigma
Schafserum	Sigma
TriPure™	Roche

Verwendete Chemikalien die nicht in der Liste aufgeführt sind, hatten mindestens p.A.-Qualität.

4.1.3 Enzyme

EcoRI	Amersham
Lysozym	Sigma
Red-Taq-DNA-Polymerase	Sigma
Proteinase K	Serva
T3-RNA Polymerase	Roche
T7-RNA Polymerase	Roche
Taq-DNA-Polymerase	Sigma
XhoI	Amersham

4.1.4 Kit-Systeme

Big Dye Solution	AbiPrism
GFX PCR DNA and gel band purification Kit	Amersham
HexaLabel™ DNA Labeling Kit	MBI Fermentas
MEGAscript™ T3 Kit	Ambion
MEGAscript™ T7 Kit	Ambion
Plasmid Mini Kit	Quiagen
QuickPrep <i>micro</i> mRNA Purification Kit	Amersham
Thermo Sequenase™ Radiolabelled Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham

4.1.5 Alkalische Phosphatase Konjugate

Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat	Roche
Streptavidin-AP-Konjugat	Roche

4.1.6 Sonstige Materialien

DNA- / RNA-Größenmarker:	
λ/HindIII Marker	MBI Fermentas
RNA-Marker II	Boehringer
Deoxiribonukleotide:	
dATP, dTTP, dCTP, dGTP	MBI Fermentas
Labeling Mix:	
DIG RNA Labeling Mix	Roche
Biotin RNA Labeling Mix	Roche
Radioaktiv markierte NTPs:	
α-[³² P]-dCTP	ICN
α-[³³ P]-ddATP	Amersham
α-[³³ P]-ddTTP	Amersham
α-[³³ P]-ddCTP	Amersham
α-[³³ P]-ddGTP	Amersham

Membranen:

Protran Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0.45 µm)	Schleicher & Schuell
Hybond-N-Nylon-Membran	Amersham

Filme:

Hyperfilm MVP	Amersham
---------------	----------

Antibiotika:

Ampicillin Natriumsalz	Sigma
Rifampicin Natriumsalz	Fluka
Tetracyclin Hydrochlorid	Sigma

Küvetten:

Elektroporationsküvetten (4 mm)	Biozym
---------------------------------	--------

4.1.7 Geräte

Elektroporator:

Gene Pulser II	BioRad
EasyjecT PLUS	Peqlab
Elektroporations-Impulsgeber EPI 2500	Dr. L. Fischer
Multiporator	Eppendorf

Mikroskopie:

Stereoscopic Zoom Microscope SMZ800	Nikon
Inverted Microscope Eclipse TE2000-S	Nikon
Digital Camera DXM1200	Nikon

Sequenzierer:

ABI Prism 310 Analyser	PE Applied Biosystems
------------------------	-----------------------

Reinstwasseranlage Ultra Clear	SG
--------------------------------	----

Wasserbad Typ 102	GFL
-------------------	-----

4.1.8 Primer

T3-Promotorsequenz: 5` ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA 3`

T7-Promotorsequenz: 5` TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA 3`

MK38:

Mk38t3-1: 5` GAA GCA TTA GAA AAA CTA AC 3`

Mk38t3-2: 5` TAG ATG CTG TTT TTG CTA C 3`

Mk38t3-3: 5` CAC AAC AAC AAC TGC TG C 3`

Mk38t7-1: 5` TTC AGC TGC TGA CTC AC 3`

MK55:

Mk55t3-1: 5` GAT TGC AAC GGG AAA GG 3`

Mk55t3-2: 5` TAA CAA AAA AAA GTC GCT TG 3`

Mk55t7-1: 5` TAT GTT CCA ACA CAT GGG 3`

MK97:

Mk97t3-1: 5` AAT CAT TAG AAG TTG CTC G 3`

MK97t3-2: 5` GCC TTA ATG CAA ACT ATG GC 3`

Mk97t3-3: 5` CGT AAA A TG TAA TAA TCA AGC 3`

Mk97t7-1: 5` TTG CCA AAA CAT TGT AAT TGA G 3`

K10-7:

K10-7t3-1: 5` GAT GGT GTG TTC AAG ACG 3`

K10-7t3-2: 5` CAA AGG ATG GTC AGG GG 3`

K10-7t3-3: 5` TTA AGT ATT ATT TTT ATT TGT TGG 3`

K10-7t7-1: 5` CAC ATT ACA GAA GCC AGC 3`

K10-7t7-2: 5` CAA ATT GAG CGT TTT CTC C 3`

K10-7t7-3: 5` GGT TTC TTA CAG CAT ATG TG 3`

Alle Primer wurden von Sigma ARK bezogen.

4.2 Methoden

Die verwendeten Lösungen sind jeweils am Ende der betreffenden Sektion angegeben.

4.2.1 Die Haltung von *Hydra vulgaris*

Die Haltung der Polypen erfolgte in Plastikschaalen bei 18 - 20°C. Pro Schale wurden etwa 500 Tiere in ca. 500 ml Hydramedium gehalten. Die Hydren waren einem künstlichen Tag-Nacht Rhythmus mit einer Lichtphase von 16 Stunden ausgesetzt. Von Montag bis Freitag jeweils zwischen 8 und 9 Uhr wurden die Polypen mit Nauplien von *Artemia salina* gefüttert. Unverdaute Futterreste wurden nach vier bis sechs Stunden durch den Austausch des Hydramediums entfernt. Durch die fünftägige Fütterung und den folgenden zwei Tage ohne Nahrung kam es bei der Kultur zu einer Teilsynchronisierung der Knospung.

Verwendete Lösungen:

Lösung A: 1 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
 0,1 mM KCl
 0,1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

gelöst in Quellwasser oder Reinstwasser

Lösung B: 1 mM NaHCO_3 (p.a.)

gelöst in Quellwasser oder Reinstwasser.

Hydramedium: Die Lösungen A und B wurden jeweils 1:1000 in Quellwasser aus einer Quelle in Schlierbach (bei Heidelberg) verdünnt. Mit dem Umzug nach Marburg (Januar 2001) wurde das Hydramedium nicht mehr mit Quellwasser sondern mit Reinstwasser angesetzt.

4.2.2 In vivo Versuche mit *Hydra vulgaris*

4.2.2.1 Regenerationsversuche

Zur Untersuchung der Kopfregeneration wurden ungefütterte Tiere im ausgestreckten Zustand mittels einer Injektionskanüle in der Mitte durchgeschnitten. Das Fußende wurde in

eine Petrischale mit sterilem Hydramedium überführt. Unterschiedliche Regenerationsstadien wurden fixiert und für *in situ*-Hybridisierungsexperimente verwendet. Bei Fußregenerationsexperimenten wurde der Schnitt im unteren Fünftel der Hydra gesetzt und das Kopfbende wie für die Kopfregeneration beschrieben weiter behandelt.

4.2.2.2 Die Induktion ektopischer Füße mittels LiCl

Adulte Polypen ohne Knospen wurden donnerstags gesammelt und eine Stunde nach Fütterung in eine 1 mM LiCl Lösung (in Hydramedium angesetzt) überführt. Die Hydren wurden anschließend noch für einen weiteren Tag gefüttert. Nach einer Inkubation von fünf Tagen (Dienstag) wurden ektopisch gebildete Füße mittels der Peroxidasefärbung (4.2.2.3) nachgewiesen.

Jungpolypen (frisch abgelöste Knospen) wurden montags gesammelt und regulär drei Tage lang gefüttert. Wie bei Versuchen mit adulten Polypen wurden auch die Jungpolypen am Donnerstag eine Stunde nach der Fütterung in eine 1 mM LiCl Lösung überführt. Die Fütterung wurde einen weiteren Tag fortgesetzt. Der Nachweis der ektopisch gebildeten Füße mittels Peroxidasefärbung (4.2.2.3) erfolgte dann nach einer Inkubation von fünf Tagen (Dienstag).

4.2.2.3 Der Nachweis ektopisch gebildeter Füße bei *Hydra vulgaris* mittels Peroxidasefärbung

Zum Nachweis von ektopisch gebildeten Füßen nach Inkubation in 1 mM LiCl für fünf Tage, wurde eine Peroxidasefärbung, wie bei Hoffmeister und Schaller (1985) beschrieben, durchgeführt. Pro Ansatz wurden 20 Tiere gefärbt.

4.2.2.4 Die Fixierung von *Hydra vulgaris*

Tiere, die mindestens 24 Stunden ungefüttert waren, wurden in 2% Urethan-Lösung für 1 min bei RT inkubiert. Es folgte der Austausch der Urethan-Lösung gegen eisgekühltes 4% Paraformaldehyd (PFA). Nach 10 Minuten wurde die 4% PFA Lösung erneuert und bei 4°C über Nacht inkubiert. Sollten die Proben für längere Zeit gelagert werden, wurde das 4% PFA gegen Methanol ausgetauscht und bei -20°C aufbewahrt.

Verwendete Lösungen:

2% Urethan und 4% PFA wurden in sterilem Hydramedium angesetzt.

4.2.2.5 Die Ganztier Elektroporation von *Hydra vulgaris*

Polypen die elektroporiert wurden, wurden zunächst für eine Stunde bei 4°C gehalten. Alle für die Ganztier Elektroporation benutzten Lösungen und Küvetten wurden vor Gebrauch Eis gekühlt. Zur Elektroporation wurden die Polypen in eine Küvette überführt und zweimal mit Elektroporationsmedium gewaschen. Das verwendete Medium war entweder deionisiertem Wasser, Hydramedium oder 0,25 x PBS und der Einsatz war vom jeweiligen Versuch abhängig (siehe 3.2.1.2). Nach dem letzten Waschschrift wurde die zu elektroporierende Probe zusammen mit dem Elektroporationsmedium in die Küvette gegeben. Nach der Auslösung des Impulses wurden die Polypen in 20% hyperosmotisches Dissoziationsmedium (Dissag) überführt und über Nacht bei 4°C gehalten. Nach Austausch der Lösung gegen 10% hyperosmotisches Dissag verblieben die Hydren für weitere 24 Stunden auf 4°C. Erst jetzt wurden sie in Hydramedium überführt und zurück in den Kulturraum (18°C – 20°C) gestellt. Eine Ausnahme bildeten Hydren, die mit FITC-Dextran elektroporiert wurden. Diese Tiere wurden nach der Inkubation in 20% hyperosmotisches Dissag mehrmals mit deionisiertem Wasser gewaschen und dann in Mowiol eingebettet.

Verwendete Lösungen:

Fluoresceinisothiocyanat-markiertes Dextran (FITC-Dextran, 10 kDa):

10 mg/ml in Elektroporationsmedium

Mowiol: 6 g Glycerin und 2,4 g Mowiol wurden 75 min bei 35 – 40°C gerührt, anschließend mit 6 ml H₂O und 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5 für weitere 75 min bei 40°C und zusätzlich über Nacht bei RT gerührt. Nach Zentrifugation bei 3000 g wurde der Überstand für die Einbettung benutzt.

Hyperosmotisches Dissoziationsmedium (Dissag):

6 mM CaCl₂
1,2 mM MgSO₄
12,5 mM TES
6 mM Natriumpyruvat
6 mM Glucose
50 mg/ml Rifampicin

4.2.3 Die Ganztier *in situ* Hybridisierung

4.2.3.1 Die verwendeten RNA-Sonden

Als Matrize für die *in vitro* Transkription der RNA-Sonde diente ein Amplikon, das an den Enden von T3 und T7 Promotoren flankiert war. Da das DNA-Fragment in der verwendeten λ ZAPII cDNA Bank (Bieller, 1997) gerichtet kloniert war, konnte mittels der T7-Polymerase die *antisense* und mittels T3-Polymerase die *sense* RNA-Sonde synthetisiert werden. Zum Markieren der Sonde wurden die T3 und T7 RNA Polymerasen und der Digoxigenin Labeling Mix bzw. der Biotin RNA Labeling Mix der Firma Roche benutzt. Zur Überprüfung der Sonde wurde ein Northern Blot durchgeführt.

4.2.3.2 Die Einzelmarkierung

Zur Identifizierung der Expression eines einzelnen Transkripts wurde eine *in situ* Hybridisierung, wie von Hassel et al. (1998) beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden ein Digoxigenin-markierte RNA Sonden benutzt und schließlich die Hybride mit BM Purple nachgewiesen. Zum Erstellen von Dauerpräparaten wurden die Objekte in Euparal (Roth) eingebettet.

4.2.3.3 Die Doppelmarkierung

Der Nachweis der Expression zweier unterschiedlicher Transkripte im selben Objekt erfolgte mittels einer Doppelmarkierung (Straub, 1996). Dabei wurde gleichzeitig mit einer Digoxigenin- und einer Biotin-markierten RNA Sonde hybridisiert. Das erste Transkript wurde mittels der Digoxigenin-markierte RNA Sonde und einer an einen Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase nachgewiesen. Für die Färbung wurde BM Purple benutzt. Zum Nachweis der Expression des zweiten Transkripts wurde die Biotin-markierte RNA Sonde mit alkalischer Phosphatase, die an Streptavidin gebunden war, verwendet. Bei der zweiten Färbung wurde FAST RED verwendet. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaft von FAST RED wurden die Objekte für die dauerhafte Aufbewahrung in Mowiol/DABCO eingebettet.

4.2.4 Molekulare Methoden

4.2.4.1 Molekulare Standardmethoden

Die molekulare Standardmethoden der Herstellung kompetenter Bakterien, der DNA Transformation, der Plasmid-DNA Aufreinigung, der Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, der Auftrennung von DNA in Agarosegele, der DNA Extraktion aus Agarosegelen und dem Restriktionsverdau wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Zur DNA-Präparation wurde das Plasmid Mini Kit von Quiagen benutzt. Gelelutionen wurden mit dem GFX PCR DNA and gel band purification Kit der Firma Amersham durchgeführt. Dabei wurde exakt das Herstellerprotokoll des jeweiligen Kits befolgt.

4.2.4.2 Die Polymerase Kettenreaktion, PCR

Die DNA-Sequenzen von MK38, MK55, MK97 und K10-7 werden von den Sequenzen des T3- und T7-Promotors flankiert. Zum standardisierten Amplifizieren dieser DNA-Sequenzen wurden T3 und T7 Primer benutzt.

PCR-Ansatz [50 µl]:	10 – 20 ng Template DNA
	0,4 mM dNTP Mix
	0,5 mM T3 und T7 Primer
	1 U Taq DNA Polymerase
	in 1 x Taq Polymerase Puffer

Standardprogramm für die Amplifikation mit T3- /T7- Promotorprimern:

Schritte	Zeit	Temperatur
1	5 min	94°C
2	1 min	94°C
3	1 min	50°C
4	3 min	72°C
5	5 min	72°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden dreißigmal wiederholt.

4.2.4.3 Sequenzierung

4.2.4.3.1 Die manuelle Sequenzierung

Bei dieser Methode wurde das Thermo SequenaseTM Radiolabelled Terminator Cycle Sequencing Kit der Firma Amersham benutzt. Dabei wurden die Proben mittels einer PCR Reaktion mit α -[³³P]-ddNTPs endständig markiert. Die Auftrennung erfolgte auf einem denaturierenden 6%-igen Polyacrylamidgel (7 M Harnstoff). Die anschließende Autoradiographie wurde mit Amersham-HyperfilmTM durchgeführt.

4.2.4.3.2 Die Sequenzierung mit ABI Prism 310 Analyser

Zur maschinellen Sequenzierung mit dem ABI Prism 310 Analyser, der Arbeitsgruppe Bautz in Heidelberg, wurde das BigDye Terminator Sequencing Kit mit Ampli Taq FS von AbiPrism benutzt.

4.2.4.3.3 Die Sequenzierungen durch die Firma Seqlab

Die Sequenzproben wurden nach Angaben der Firma Seqlab vorbereitet und zur Sequenzierung an die Firma geschickt.

4.2.4.3.4 Die Sequenzanalyse

Folgende Programme wurden für die Analyse der Sequenzen benutzt:

HUSAR Heidelberg: www.genius.embnet.dkfz-heidelberg.de

NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov

Bioedit: www.mbio.nscu.edu/BioEdit/bioedit.html

4.2.4.4 Die Isolierung von RNA aus *Hydra vulgaris*

4.2.4.4.1 Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *Hydra vulgaris*

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *Hydra vulgaris* wurden pro Ansatz 200 Polypen und das 1 ml TriPureTM Isolationsreagenz der Firma Roche verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

4.2.4.4.2 Die Isolierung von poly(A)⁺-RNA aus *Hydra vulgaris*

Zur Isolierung von poly(A)⁺-RNA wurde das QuickPrep *micro* mRNA Purification Kit der Firma Amersham verwendet. Pro Ansatz wurden 100 Polypen eingesetzt.

4.2.4.5 Die Northern Blot Analyse

Formaldehydgel: Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem 0,8%igen Formaldehydgel nach Sambrook et al. (1989). Aufgetragen wurden 5 µg mRNA und 20 µg Gesamt-RNA. Anschließend wurde die RNA auf eine Hybond-N-Nylon-Membran von Amersham transferiert. Zur Herstellung der DNA-Sonden wurde das HexaLabelTM DNA Labeling Kit benutzt. Als Template-DNA dienten PCR-Produkte. Markiert wurden die Sonden mit α-[³²P]-dCTP. Pro Ansatz wurden 30 µCi anstelle der empfohlenen 50 µCi α-[³²P]-dCTP eingesetzt. Die Autoradiographie wurde mit Amersham-HyperfilmTM durchgeführt.

4.2.4.6 Die Synthese der Doppelstrang-RNA (dsRNA)

Zur Synthese der dsRNA wurde ein PCR-Produkt des zu untersuchenden Gens benutzt. Das Amplikon war mittels Gelelution aufgereinigt. Die RNA-Synthese des Sense- und Antisensstranges erfolgte mit dem T3 und T7 MEGAscriptTM Kit (Ambion) nach Angaben des Herstellers. Die synthetisierte RNA wurde mit 2,5 M Kaliumacetat und Glycogen (10 mg/ml) gefällt, in DEPC behandeltem Wasser aufgenommen und photometrisch vermessen. Zur Hybridbildung der Einzelstränge wurde der Hybridisierungsansatz bei 65°C für 15 min in einem Wasserbad erhitzt. Es folgte ein langsames Abkühlen auf 30 – 25°C innerhalb 2,5 - 3 Std.

Hybridisierungsansatz:	Je 5,5 µl RNA [5 µg]
	2,8 µl 20 x SSC

Zur Überprüfung der Hybridisierung wurden Einzelstrang-RNA (ssRNA) und dsRNA zusammen auf einem 2% Agarosegel aufgetragen (Abb. 41). Zur Auftrennung der RNA-Proben wurde das TAE-Puffer System gewählt (Sambrook et al., 1989). Ein erfolgreiches Hybridisieren hat eine Veränderung der Laufeigenschaften der dsRNA gegenüber der ssRNA zur Folge. Aufgrund ihrer Größe läuft die dsRNA langsamer als die ssRNA.

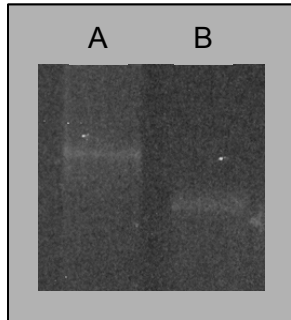


Abb. 41: Vergleich Einzelstrang- und Doppelstrang-RNA. Auftrag von (A) Doppelstrang-RNA und (B) Einzelstrang-RNA auf ein 2% Agarosegel zur Überprüfung der Hybridisierung der komplementären Einzelstrang-RNAs.

5 Literatur

- Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B. und de Rosa, R.** (2000). The new animal phylogeny: Reliability and implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4453-4456.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D.** (1997). Molekularbiologie der Zelle. VCH.
- Alewood, D., Nielsen, K., Alewood, P. F., Craik, D. J., Andrews, P., Nerrie, M., White, S., Domagala, T., Walker, F., Rothacker, J., Burgess, A. W. und Nice, E. C.** (2005). The role of disulfide bonds in the structure and function of murine epidermal growth factor (mEGF). *Growth Factors*. **23**, 97-110.
- Andrade, M. A. und Bork, P.** (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat. Genet.* **11**, 115-116.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsumno, K. und Fortini, M. E.** (1995). Notch signaling. *Science*. **268**, 225-232.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. und Lake, R. J.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. **284**, 770-776.
- Bachinger, H. P.** (1987). The influence of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase on the in vitro folding of type III collagen. *J. Biol. Chem.* **262**, 17144-17148.
- Barnham, K. J., Torres, A. M., Alewood, D., Alewood, P. F., Domagala, T., Nice, E. C. und Norton, R. S.** (1998). Role of the 6-20 disulfide bridge in the structure and activity of epidermal growth factor. *Protein Sci.* **7**, 1738-1749.
- Baum, C., Forster, P., Hegewich-Becker, S. und Harbers, K.** (1994). An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques*. **17**, 1058-1062.
- Baumgartner, S. und Chiquet-Ehrismann, R.** (1993). Ten^a, a *Drosophila* gene related to tenascin, shows selective transcript localization. *Mech. Dev.* **40**, 165-176.
- Baumgartner, S., Martin, D., Hagios, C. und Chiquet-Ehrismann, R.** (1994). Ten^m, a *Drosophila* gene related to tenascin, is a new pair-rule gene. *EMBO J.* **13**, 3728-3740.
- Becker, C. G., Schweitzer, J., Feldner, J., Becker, T. und Schachner, M.** (2003). Tenascin-R as a repellent guidance molecule for developing optic axons in zebrafish. *J. Neurosci.* **23**, 6232-6237.
- Ben-Zur, T., Feige, E., Motro, B. und Wides, R.** (2000). The mammalian Odz gene family: homologs of a *Drosophila* pair-rule gene with expression implying distinct yet overlapping developmental roles. *Dev. Biol.* **217**, 107-120.
- Ben-Zur, T. und Wides, R.** (1999). Mapping homologs of *Drosophila* odd Oz (odz): Doc4/Odz4 to mouse chromosome 7, Odz1 to mouse chromosome 11; and ODZ3 to human chromosome Xq25. *Genomics*. **58**, 102-103.
- Bibb, C. und Campbell, R. D.** (1973). Tissue healing and septate desmosome formation in *Hydra*. *Tissue Cell* **5**, 23-35.

- Bieller, A.** (1997). Musterbildung und Genexpression unter Einfluss von Lithium-Ionen bei Hydra. *Dissertation*. Universität Heidelberg.
- Blasi, F., Vassalli, J. D. und Dano, K.** (1987). Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J. Cell Biol.* **104**, 801-804.
- Bode, H., Berking, S., David, C. N., Gierer, A., Schaller, H., und Trenker, E.** (1973): Quantitative analysis of cell types during growth and morphogenesis in *Hydra*. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **171**, 269-285.
- Bosch, T. C. G., Augustin, R., Gellner, K., Khalturin, K. und Lohmann, J. U.** (2002). In vivo electroporation for genetic manipulations of whole *Hydra* polyps. *Differentiation*. **70**, 140-147.
- Bridge, D. M., Stover, N. A. und Steele, R. E.** (2000). Expression of a novel receptor tyrosine kinase gene and a paired-like homeobox gene provides evidences of differences in patterning at the oral and aboral ends of *Hydra*. *Dev. Bio.* **220**, 253-262.
- Brien, P. und Reniers-Decoen, M.** (1949). La croissance, la blastogénèse, l'ovogénèse chez *Hydra fusca* (Pallas). *Bull. Biol. France et Belg.* **83**, 293-386.
- Bristow, J., Tee, M. K., Gitelman, S. E., Mellon, S. H. und Miller, W.** (1993). Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J. Cell Biol.* **122**, 265-278.
- Broun, M. und Bode, H. R.** (2002). Characterization of the head organizer in *Hydra*. *Development* **129**, 875-884.
- Broun, M., Gee, L., Reinhardt, B. und Bode, H. R.** (2005). Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway. *Development*. **132**, 2907-2916.
- Browne, E. N.** (1909). The Production of new hydrants in hydra by insertion of small grafts. *J. Exp. Zool.* **7**, 1-37.
- Burnett, A. L.** (1966). A model of growth and cell differentiation in *Hydra*. *Am. Naturalist*. **100**, 165-190.
- Campbell, R. D.** (1967a). Tissue Dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*: I. Patterns of cell division. *Dev. Biol.* **15**, 487-502.
- Campbell, R. D.** (1967b). Tissue Dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*: II. Patterns of tissue movement. *J. Morph.* **121**, 19-28.
- Campbell, R. D.** (1973). Vital marking of single cells in developing tissues: Indika ink injection to trace tissue movements in *Hydra*. *J. Cell. Sci.* **13**, 651-661.
- Campbell, R. D.** (1976). Elimination of *Hydra* interstitial and nerve cells by means of colchicine. *J. Cell Sci.* **21**, 1-13.
- Carnemolla, B., Leprini, A., Borsi, L., Querze, G., Urbini, S. und Zardi, L.** (1996). Human Tenascin-R. Complete primary structure, pre-mRNA alternative splicing and gene localization on chromosome 1q23-q24. *J. Biol. Chem.* **271**, 8157-8160.
- Carninci, P. und Hayashizaki, Y.** (1999). High-efficiency full-length cDNA cloning. *Meth. Enzymol.* **303**, 19-44.

- Chapin, S. J. und Bulinski, J. C.** (1991). Non-neuronal 210 x 10(3) Mr microtubule-associated protein (MAP4) contains a domain homologous to the microtubule-binding domains of neuronal MAP2 and tau. *J. Cell Sci.* **98**, 27-36.
- Chapin, S. J. und Bulinski, J. C.** (1992). Microtubule stabilization by assembly-promoting microtubule-associated proteins: a repeat performance. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **23**, 236-243.
- Charrasse, S., Mazel, M., Taviaux, S., Berta, P., Chow, T. und Larroque, C.** (1995). Characterization of the cDNA and pattern of expression of a new gene over-expressed in human hepatomas and colonic tumors. *Eur. J. Biochem.* **234**, 406-413.
- Charrasse, S., Schroeder, M., Gauthier-Rouviere, C., Ango, F., Cassimeris, L., Gard, D. L. und Larroque, C.** (1998). The TOGp protein is a new human microtubule-associated protein homologous to the Xenopus XMAP215. *J. Cell Sci.* **111**, 1371-1383.
- Clarkson, S. und Wolpert, L.** (1967). Bud morphogenesis in *Hydra*. *Nature* **214**, 780-783.
- Collins, A. G.** (1998). Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of bilateria: An analysis of 185 rRNA molecular evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 15458-15463.
- Croff, S. C. und Brunett, A.** (1969). Morphogenesis in *Hydra*: I. Peduncle and basal disc formation at the distal end of regenerating hydra after exposure to colchicine. *J. Embryol. Exp. Morph.* **21**, 417-43.
- Cullen, C. F., Deak, P., Glover, D. M. und Ohkura, H.** (1999). mini spindles: A gene encoding a conserved microtubule-associated protein required for the integrity of the mitotic spindle in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **146**, 1005-1018.
- Cummings, S. G. und Bode, H. R.** (1984). Head regeneration and polarity reversal in *Hydra attenuata* can occur in the absence of DNA synthesis. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **194**, 79-86.
- David, C. N.** (1973). A quantitative method for maceration of hydra. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **171**, 259-268.
- Davis, L. E., Brunett, A. L. und Haynes, J. F.** (1968). Histological ultra-structural study of the muscular and nervous systems in *Hydra*. II. Nervous system. *J. Exp. Zool.* **167**, 295-332.
- Davis, L. E.** (1973). Histological and ultrastructural studies of the basal disk of *Hydra*. *Z. Zellforsch.* **139**, 1-45.
- Davis, L. E.** (1975). Histological and ultrastructural studies of the basal disk of *Hydra*. III. The gastrodermis and the mesoglea. *Cell Tissue Res.* **162**, 107-118.
- Davis, C. G.** (1990). The many faces of epidermal growth factor repeats. *New. Biologist.* **2**, 410-419.
- Deutzmann, R., Fowler, S. J., Zhang, X., Boone, S., Dexter, S., Boot-Handford, R. P., Rachel, R. und Sarras, M. P. Jr.** (2000). Molecular, biochemical and functional analysis of a novel and developmentally important fibrillar collagen (Hcol-I) in hydra. *Development.* **127**, 4669-4680.

- Diehl, F. und Burnett, A.** (1965). The role of interstitial cells in the maintenance of *Hydra*: II. Budding. *J. Exp. Zool.* **158**, 283-298.
- Drabikowski, K., Trzebiatowska, A. und Chiquet-Ehrismann, R.** (2005). *Ten-1*, an essential gene for germ cell development, epidermal morphogenesis, gonad migration and neuronal pathfinding in *Caenorabditis elegans*. *Dev. Biol.* **282**, 27-38.
- Duveaux-Miret, O., Stefano, G. B., Smith, E. M., Dissous, C. und Capron, A.** (1992). Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Shistosoma mansoni* by release of immunoactive neuropeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 778-781.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. und Tuschel, T.,** (2001a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188-200.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl.** (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* **20**, 6877-6888.
- Eleftheriou, F., Exposito, J. Y., Garrone, R. und Lethias, C.** (1997). Characterization of the bovine Tenascin-X. *J. Biol. Chem.* **272**, 22866-22874.
- Fabila, Y., Navarro, L., Fujisawa, T. und Salgado, L. M.** (2002). Selective inhibition of protein kinases blocks the formation of a new axis, the beginning of budding, in *Hydra*. *Mech. Dev.* **119**, 157-164.
- Fascetti, N und Baumgartner, S.** (2002). Expression of *Drosophila* Ten-a, a dimeric receptor during embryonic development. *Mech. Dev.* **114**, 197-200.
- Feng, K., Zhou, X. H., Oohashi, T., Morgelin, M., Lustig, A., Hirakawa, S., Ninomiva, Y., Engel, J., Rauch, U. und Fassler, R.** (2002). All four members of the Ten-m/Odz family of transmembrane proteins form dimers. *J. Biol. Chem.* **277**, 128-135.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorahabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Fischer, D. A. und Bode, H. R.** (1989). Nucleotide sequence of an actin-encoding gene from *Hydra attenuata*: structural characteristics and evolutionary implications. *Gene.* **84**, 55-64.
- Fischer, G. und Bang, H.** (1985). The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochim. Biophys. Acta.* **828**, 39-42.
- Fowler, S. J., Jose, S., Zhang, X., Deutzmann, R., Sarras, M. P. Jr. und Boot-Handford, R. P.** (2000). Characterization of hydra type IV collagen. Type IV collagen is essential for head regeneration and its expression is up-regulated upon exposure to glucose. *J. Biol. Chem.* **275**, 39589-39599.
- Fuss, B., Wintergerst, E. S., Bartsch, U. und Schachner, M.** (1993). Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to Tenascin. *J. Cell Biol.* **120**, 1237-1249.
- Galliot, B.** (2000). Conserved and divergent genes in apex and axis development of cnidarians. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 629-637.

- Garcia, M. A., Vardy, L., Koonrugsa, N. und Toda, T.** (2001). Fission yeast ch-TOG/XMAP215 homologue Alp14 connects mitotic spindles with the kinetochore and is a component of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *EMBO J.* **20**, 3389-3401.
- Gard, D. L., Becker, B. E. und Josh Romney, S.** (2004). MAPping the eukaryotic tree of life: structure, function, and evolution of the MAP215/Dis1 family of microtubule-associated proteins. *Int. Rev. Cytol.* **239**, 179-272.
- Gard, D. L., und Kirschner, M. W.** (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J. Cell Biol.* **105**, 2203-2215.
- Gierer, A. und Meinhardt, H.** (1972). A theory of biological pattern formation. *Kybernetik.* **12**, 30-39.
- Graf, R., Daumberer, C. und Schliwa, M.** (2000). Dictyostelium DdCP224 is a microtubule-associated protein and a permanent centrosomal resident involved in centrosome duplication. *J. Cell Sci.* **113**, 1747-1758.
- Graf, L. und Gierer, A.** (1980). Size, shape and orientation of cells in budding *Hydra* and regulation of regeneration in cell aggregates. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **188**, 141-151.
- Grens, A., Shimizu, H., Hoffmeister, S. A. H., Bode, H. R. und Fujisawa, T.** (1999). The novel signal peptides. Pedibin and Hym-346, lower positional value thereby enhancing foot formation in *Hydra*. *Development.* **126**, 517-524.
- Grimmelikhuijzen, C. J. P. und Schaller, H. C.** (1977). Isolation of a substance activating foot formation in *Hydra*. *Cell. Differ.* **6**, 297-305.
- Grimmelikhuijzen, C. J. P., Leviev, L. I und Carstensen, K.** (1996). Peptides in the nervous system of cnidarians: structure, function and biosynthesis. *Int. Rev. Cytol.* **167**, 37-89.
- Hadzi, H.** (1909). Über das Nervensystem von *Hydra*. *Arb. Zool. Uni. Inst. Wien.* **17**, 225-268.
- Hänze, J., Fischer, L., Koenen, M., Worgall, S. und Rascher W.** (1998). Electroporation of nucleic acids into prokaryotic and eukaryotic cells by square wave pulses. *Biotechnol tech.* **12**, 159-163.
- Hagios, C., Koch, M., Spring, J., Chiquet, M. und Chiquet-Ehrismann, R.** (1996). Tenascin-Y: a protein of novel domain structure is secreted by differentiated fibroblasts of muscle connective tissue. *J. Cell Biol.* **134**, 1499-1512.
- Hamilton, A. J. und Blaucombe, D. C.** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* **286**, 950-952.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D und Hannon, G. J.,** (2000). An RNA-directed nuclease mediates postranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* **404**, 293-296.
- Hannon, G. J.** (2002). RNA interference. *Nature.* **418**, 244-251.
- Harafuji, N., Takahashi, T., Hatta, M., Tezuka, H., Morishita, F., Matsushima, O. und Fujisawa, T.** (2001). Enhancement of foot formation in *Hydra* by a novel epitheliopeptide, Hym-323. *Development.* **128**, 437-446.

- Hassel, M. und Berking, S.** (1990). Lithium ions interfere with pattern control in *Hydra vulgaris*. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **198**, 382-388.
- Hassel, M., Albrecht, K. und Hofheinz, S.** (1993). Pattern formation in *Hydra vulgaris* is controlled by lithium-sensitive processes. *Dev. Biol.* **156**, 362-371.
- Hassel, M. und Bieller, A.** (1996). Stepwise transfer from high to low lithium concentration increases the head-forming potential in *Hydra vulgaris* and possibly activates the PI cycle. *Dev. Biol.* **177**, 439-448.
- Hassel, M., Bridge, D., Stover, N., Kleinholz, H. und Steele, R.** (1998). The level of expression of a protein kinase C may be an important component of the patterning process in *Hydra*. *Dev. Genes Evol.* **207**, 502-514.
- Hershko, A. und Ciechanover, A. A.** (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 761-807.
- Hicklin, J., Hornbruch, A. und Wolpert, L.** (1969). Inhibition of the hypostome formation and polarity reversal in *Hydra*. *Nature*. **221**, 1268-12711.
- Hicklin, J. und Wolpert, L.** (1973). Positional information and pattern regulation in *Hydra*: the effect of gamma-radiation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **30**, 741-752.
- Ho, S. Y. und Mittal, G. S.** (1996). Electroporation of cell membranes: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **16**, 349-362.
- Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C. M., von Laue, C. C., Snyder, P., Rothbacher, U. und Holstein, T. W.** (2000). WNT signalling molecules act in axis formation the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature*. **407**, 186-189.
- Hoffmeister, S. A. und Schaller, H. C.** (1985). A new biochemical marker for foot-specific cell differentiation in *Hydra*. *Roux's Dev. Biol.* **194**, 453-461.
- Hoffmeister, S. A.** (1989). Action of foot activator on growth and differentiation of cells in *Hydra*. *Dev. Biol.* **133**, 254-261.
- Hoffmeister, S. A. H.** (1996). Isolation and characterization of two morphogenetically active peptides from *Hydra vulgaris*. *Development*. **122**, 1941-1946.
- Hoffmeister-Ullerich, S. A. H.** (2001). The foot formation stimulating peptide pedibin is also involved in patterning of the head in *Hydra*. *Mech. Dev.* **106**, 37-45.
- Hoffmeister-Ullerich, S. A. H., Herrmann, D., Kielholz, J., Schweizer, M. und Schaller, H. C.** (2002). Isolation of a putative peroxidase, a target for factors controlling foot-formation in the coelenterate *Hydra*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4597-4606.
- Holstein, T. W., Hobmayer, E. und David, C. N.** (1991). Pattern of epithelial cell cycling in *Hydra*. *Dev. Biol.* **148**, 602-611.
- Hornbruch, A. und Wolpert, L.** (1975). Polarity reversal in *Hydra* by oligomycin. *J. Embryol. Exp. Morph.* **33**, 845-852.
- Hosono, M., Ishikawa, K., Mineki, R., Murayama, K., Numata, C., Ogawa, Y., Takayanagi, Y. und Nitta, K.** (1999). Tandem repeat structure of rhamnose-binding lectin from catfish (*Silurus asotus*) eggs. *Biochim Biophys Acta* **1472**, 668-675.

- Hosono, M., Kawauchi, H., Nitta, K., Takayanagi, Y., Shiokawa, H., Mineki, R. und Murayama, K.** (1993). Purification and characterization of *Silurus asotus* (catfish) roe lectin. *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 1-5.
- Ikuta, T., Sogawa, N., Ariga, H., Ikemura, T. und Matsumoto, K.** (1998). Structural analysis of mouse tenascin-X: evolutionary aspects of reduplication of FNIII repeats in the tenascin gene family *Gene*. **217**, 1-13.
- Jones, P. L. und Jones, F. S.** (2000). Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol.* **19**, 581-596.
- Kammerer, R. A., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Fischer, D. und Engel, J.** (1998). Tenascin-C hexabrachion assembly is a sequential two-step process initiated by coiled-coil alpha-helices. *J. Biol. Chem.* **273**, 10602-10608.
- Kanajew, J.** (1930). Zur Frage der Bedeutung der interstitiellen Zellen bei *Hydra*. *Arch. Entwicklungsmech. Organ.* **122**, 736-759.
- Kasahara, S. und Bosch, T. C. G.** (2003). Enhanced antibacterial activity in *Hydra* polyps lacking nerve cells. *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 79-85.
- Klenk, M.** (1999). Identifikation von regio-spezifisch exprimierten Genen durch in situ Screening. *Staatsexamensarbeit*. Universität Heidelberg.
- Kobayakawa, Y. und Kodama, R.** (2002). Foot formation in *Hydra*: Commitment of the basal disk cell in the lower peduncle. *Develop. Growth Differ.* **44**, 517-526.
- Kortschak, R. D., Samuel G., Saint R. und Miller D. J.** (2003). EST Analysis of the Cnidarian *Acropora millepora* Reveals Extensive Gene Loss and Rapid Sequence Divergence in the Model Invertebrates. *Curr. Biol.* **13**, 2190-2195.
- Kozak, M.** (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 messenger RNAs. *Nucl. Acid Res.* **15**, 8125-9148.
- Krajhans, A.** (1990). Egg lectins of invertebrates and lower vertebrates: properties and biological function. *Adv. Lectin Res.* **3**, 83-131.
- Krieger, J., Strobel, J., Vogel, A., Hanke, W. und Breer, H.** (1999). Identification of a cyclic nucleotide- and voltage-activated ion channel from insect antennae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 255-267.
- Kumpfmüller, G., Rybakine, V., Takahashi, T., Fujisawa, T. und Bosch, T. C. G.** (1999). Identification of an astacin matrix metalloprotease as target gene for *Hydra* foot activator peptides. *Dev. Genes Evol.* **209**, 601-607.
- Kyte, J. und Doolittle, R. F.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Lam, Y., W., und Ng, T.,B.,** (2002). Purification and characterization of a rhamnose-binding lectin with immunoenhancing activity from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) ovaries. *Protein Expr. Purif.* **26**, 378-385.
- Lang, K., Schmid, F. X. und Fischer, G.** (1987). Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature*. **329**, 268-270.

- Lang, K. und Schmid, F. X.** (1988). Protein-disulphide isomerase and prolyl isomerase act differently and independently as catalysts of protein folding. *Nature*. **331**, 453-455.
- Le-Nguven, D., Heitz, A., Chiche, L., el Hajji, M. und Castro, B.** (1993). Characterization and 2D NMR study of the stable [9-21, 15-27] 2 disulfide intermediate in the folding of the 3 disulfide trypsin inhibitor EETI II. *Protein Sci.* **2**, 165-174.
- Leontovich, A. A., Zhang, J., Shimokawa, K., Nagase, H. und Sarras Jr, M. P.** (2000). A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process. *Development*. **127**, 907-920.
- Letunic, I., Copley, R. R., Schmidt, S., Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C. P. und Bork, P.** (2004). SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic. Acids. Res.* **32**, 142-144.
- Levine, A., Bashan-Ahrend, A., Budai-Hadrian, O., Gartenberg, D., Menasherow, S. und Wides, R.** (1994). Odd Oz: a novel *Drosophila* pair rule gene. *Cell*. **77**, 587-598.
- Levine, A., Weiss, C. und Wides, R.** (1997a). Expression of the pair-rule gene odd Oz (odz) in imaginal tissues. *Dev. Dyn.* **209**, 1-14.
- Levine, A., Gartenberg, D., Yakov, R., Lieberman, Y., Budai-Hadrian, O., Bashan-Ahrend, A. und Wides, R.** (1997b). The genetics and molecular structure of the *Drosophila* pair-rule gene odd Oz (odz). *Gene*. **200**, 59-74.
- Lohmann, J. U., Endl, I. und Bosch, T. C.** (1999). Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Dev. Biol.* **214**, 211-214.
- MacWilliams, H. K., Harry, K. und Kafatos, F. C.** (1974). The basal inhibition in *Hydra* may be mediated by a diffusing substance. *Am. Zool.* **14**, 633-645.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. und Tuschl, T.** (2002a). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. **110**, 563-574.
- Matés, J. M., Perez-Gomez, C. und Numez de Castro, I.** (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **32**, 595-603.
- Mattes, O.** (1925). Die histologischen Vorgänge bei der Wundheilung und Regeneration von *Hydra*. *Zool. Anz.* **62**, 307-312.
- Matthews, L. R., Carter, P., Thierry-Mieg, D. und Kempfues, K.** (1998). ZYG-9, a *Caenorhabditis elegans* protein required for microtubule organization and function, is a component of meiotic and mitotic spindle poles. *J. Cell Biol.* **141**, 1159-1168.
- Mieda, M., Kikuchi, Y., Hirate, Y., Aoki, M. und Okamoto, H.** (1999). Compartmentalized expression of zebrafish ten-m3 and ten-m4, homologues of the *Drosophila* ten(m)/odd Oz gene, in the central nervous system. *Mech. Dev.* **87**, 223-227.
- Miljkovic, M., Mazet, F. und Galliot, B.** (2002). Cnidarian and bilaterian promoters can direct GFP expression in transfected hydra. *Dev. Biol.* **246**, 377-390.
- Miller, D. J., Ball, E. E. und Technau, U.** (2005). Cnidarians and ancestral genetic complexity in the animal kingdom. *Trends Genet.* **21**, 536-539.

- Minet, A. D., Rubin, B. P., Tucker, R. P., Baumgartner, S. und Chiquet-Ehrismann, R.** (1999). Teneurin-1, a vertebrate homologue of the *Drosophila* pair-rule gene ten-m, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain. *J. Cell Sci.* **112**, 2019-2032.
- Minet, A. D. und Chiquet-Ehrismann, R.** (2000). Phylogenetic analysis of teneurin genes and comparison to the rearrangement hot spot elements of *E. coli*. *Gene*. **257**, 87-97.
- Minobe, S., Fei, K., Sarras, M. Jr., und Werle, M.** (2000). Identification and characterization of the epithelial polarity receptor "Frizzled" in *Hydra vulgaris*. *Dev. Genes. Evol.* **210**, 258-262.
- Montgomery, M. K., Xu, S. und Fire, A.** (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 15502-15507.
- Moore, L. B. und Campbell, R. D.** (1973). Bud initiation in a non-budding strain of *Hydra*: Role of interstitial cells. *J. Exp. Zool.* **184**, 397-408.
- Müller, W. A.** (1989). Diacylglycerol-induced multihead formation in *Hydra*. *Development*. **105**, 309-316.
- Müller, W. A.** (1990). Ectopic head and foot formation in *Hydra*: Diacylglycerol-induced increase in positional value and assistance of the head in foot formation. *Differentiation*. **42**, 131-143.
- Müller, W. A.** (1995). Competition for factors and cellular resources as a principle of pattern formation in *Hydra*: II. Assistance of the foot formation by heads and buds and a new model of pattern control. *Dev. Biol.* **167**, 175-189.
- Müller, W. A.** (1996). Pattern formation in the immortal *Hydra*. *TIG*. **12**, 91-96.
- Müller, W. A., Berking, S. und Plickert, G.** (1988). Das Experiment: *Hydra* in Labor und Unterricht. Teil A. Hydrozoen und das Stammzellenprinzip. *Biologie in unserer Zeit*. **6**, 174-180.
- Müller, W. A. und Hassel, M.** (2002). Entwicklungsbiologie der Tiere und des Menschen. Springer.
- Müller, W.A., Leitz, T., Stephan, M. und Lehmann, W.S.** (1993). Arachidonic acid and the control of the body pattern in *Hydra*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **202**, 70-76.
- Nabeshima, K., Kurooka, H., Takeuchi, M., Kinoshita, K., Nakaseko, Y. und Yanagida, M.** (1995). p93dis1, which is required for sister chromatid separation, is a novel microtubule and spindle pole body-associating protein phosphorylated at the Cdc2 target sites. *Genes Dev.* **9**, 1572-1585.
- Nakaseko, Y., Goshima, G., Morishita, J. Und Yanagida, M.** (2001). M phase-specific kinetochore proteins in fission yeast: microtubule-associating Dis1 and Mtc1 display rapid separation and segregation during anaphase. *Curr. Biol.* **11**, 537-549.
- Neidhardt, J., Fehr, S., Kutsche, M., Lohler, J. und Schachner, M.** (2003). Tenascin-N: characterization of a novel member of the tenascin family that mediates neurite repulsion from hippocampal explants. *Mol. Cell Neurosci.* **23**, 193-209.
- Neumann, E., Kakorin, S. und Toensing, K.** (1999). Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **48**, 3-16.

- Neumann, E., Kakorin, S., Tsoneva, I., Nikolova, B. und Tomoy, T.** (1996). Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation by electroporation. *Biophys. J.* **71**, 868-877.
- Neumann, E., Toensing, K., Kakorin, S., Budde, P. und Frey, J.** (1998). Mechanism of electroporative dye uptake by mouse B cells. *Biophys. J.* **74**, 98-108.
- Neumann, E. und Rosenheck, K.** (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* **10**, 279-290.
- Neuwald, A. F. und Hirano, T.** (2000). HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res.* **10**, 1445-1452.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K. und Ullu, E.** (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 14687-14692.
- Nies, D. E., Heesath, T. J., Kim, J. H., Gulcher, J. R. und Stefansson, K.** (1991). The complete cDNA sequence of human hexabrachion (Tenascin). A multidomain protein containing unique epidermal growth factor repeats. *J. Biol. Chem.* **266**, 2818-2823.
- Nishi, T., Weinstein, J., Gillespie, W. M. und Paulson, J. C.** (1991). Complete primary structure of porcine tenascin. Detection of tenascin transcripts in adult submaxillary glands. *Eur. J. Biochem.* **202**, 643-648.
- Noda, K. und Egami, N.** (1975). Regeneration of transplanted intact cell populations in lethally irradiated *Hydra*. *Radiat. Res.* **63**, 174-184.
- Norenberg, U., Wille, H., Wolff, J. M., Frank, R., Rathjen, F. G.** (1992). The chicken neural extracellular matrix molecule restrictin: similarity with EGF-, fibronectin type III-, and fibrinogen-like motifs. *Neuron.* **8**, 849-863.
- Nykanen, A., Haley, B. und Zamore, P. D.** (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell.* **107**, 309-321.
- Ohkura, H., Adachi, Y., Kinoshita, N., Niwa, O., Toda, T. und Yanagida, M.** (1988). Cold-sensitive and caffeine-supersensitive mutants of the *Schizosaccharomyces pombe* dis genes implicated in sister chromatid separation during mitosis. *EMBO J.* **7**, 1465-1473.
- Okamoto, M., Tsutsui, S., Tasumi, S., Suetake, H., Kikuchi, K. und Suzuki, Y.** (2005). Tandem repeat L-rhamnose-binding lectin from the skin mucus of ponyfish, *Leiognathus nuchalis*. *Biochem Biophys Res Commun.* **333**, 463-469.
- Oohashi, T., Zhou, X. H., Feng, K., Richter, B., Mörgelin, M., Perez, M. T., Su, W. D., Chiquet-Ehrismann, R., Rauch, U. und Fässler, R.** (1999). Mouse ten-m/Odz is a new family of dimeric type II transmembrane proteins expressed in many tissues. *J. Cell Biol.* **145**, 563-577.
- Otaki, J. M. und Firestein, S.** (1999a). Neurestin: putative transmembrane molecule implicated in neuronal development. *Dev. Biol.* **212**, 165-181.
- Otaki, J. M. und Firestein, S.** (1999b). Segregated expression of neurestin in the developing olfactory bulb. *Neuroreport.* **10**, 2677-2680.
- Otto, J. J. und Campbell, R. D.** (1977). Budding in *Hydra attenuata*: Bud stages and fate map. *J. Exp. Zool.* **200**, 417-428.

- Otto, J. J.** (1977). Orientation and behaviour of epithelial cell muscle processes during *Hydra* budding. *J. Exp. Zool.* **202**, 307-322.
- Ozeki, Y., Matsui, T., Suzuki, M. und Titani, K.** (1991). Amino Acid sequence and molecular characterization of a D-Galactoside-specific lectin purified from sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) Eggs. *Biochemistry.* **30**, 2391-2394.
- Pearson, C. A., Pearson, D., Shibahara, S., Hofsteenge, J. und Chiquet-Ehrismann, R.** (1998). Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. *EMBO J.* **7**, 2977-2982.
- Pesheva, P., Probstmeier, R., Skubitz, A. P., McCarthy, J. B., Furcht, L. T. und Schachner, M.** (1994). Tenascin-R (J1 160/180 inhibits fibronectin-mediated cell adhesion-functional relatedness to tenascin-C. *J. Cell Sci.* **107**, 2323-2333.
- Pérez, F. und Berking, S.** (1994). Protein kinase modulators interfere with bud formation in *Hydra vulgaris*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **203**, 284-289.
- Philpott, D. E., Chart, A. B. und Burnett, A. L.** (1966) A study of the secretory granules of the basal disk of *Hydra*. *J. Ultrastruct. Res.* **14**, 74-84.
- Picot, D., Loll, P. J. und Garavito, R. M.** (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature.* **367**, 243-249.
- Robertson, H. M.** (1997). Multiple Mariner transposons in flatworms and hydras are related to those of insects. *J. Herd.* **88**, 195-201.
- Rouzankina, I., Abate-Shen, C. und Niswander, L.** (2004). Dlx genes integrate positive and negative signals during feather bud development. *Dev. Biol.* **265**, 219-233.
- Rubin, B. P., Tucker, R. P., Martin, D. und Chiquet-Ehrismann, R.** (1999). Teneurins: a novel family of neuronal cell surface proteins in vertebrates, homologous to the Drosophila pair-rule gene product Ten-m. *Dev. Biol.* **216**, 195-209.
- Saga, Y., Tsukamoto, T., Jing, N., Kusakabe, M. und Sakakura, T.** (1991). Murine tenascin: cDNA cloning, structure and temporal expression of isoforms. *Gene.* **104**, 177-185.
- Salzet, M., Vieau, D. und Day, R.** (2000). Crosstalk between nervous and immune systems through the animal kingdom: focus on opioids. *Trends. Neurosci.* **23**, 550-555.
- Salzet, M.** (2001). Neuropeptide precursor processing in immunocytes: involvement in the neuroimmune communication. *Mod. Asp. Immunobiol.* **2**, 43-47.
- Sambrook, J., Fritsch, E. J. und Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. 2 Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoro, B., Liu, D. T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A. und Tibbs, G. R.** (1998). Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell.* **93**, 717-729.
- Sarras, M. P. Jr., Meador, D. und Zhang, X. M.** (1991). Extracellular matrix (mesoglea) of *Hydra vulgaris*. II. Influence of collage and components on head regulation. *Dev. Biol.* **148**, 495-500.
- Savage, C. R., Jr., Hash, J. H. und Cohen, S.** (1973). Epidermal growth factor. Location of disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **248**, 7669-7672.

- Schenk, S. und Chiquet-Ehrismann, R.** (1994). Tenascins. *Methods. Enzymol.* **245**, 52-61.
- Scherberich, A., Tucker, R. P., Samandari, E., Brown-Luedi, M., Martin, D. und Chiquet-Ehrismann, R.** (2004). Murine Tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. *J. Cell. Sci.* **117**, 571-581.
- Schinko, E.** (2002). Charakterisierung von mRNAs, die während der Knospung von Hydra verstärkt exprimiert werden: Expressionsmuster in morphogenetisch aktiven Tieren und Sequenzanalyse. Universität Heidelberg.
- Schmidt, T. und Schaller, H. C.** (1976). Evidence for a foot-inhibiting substance in *Hydra*. *Cell differ.* **5**, 151-159.
- Shimizu, H., Zhang, X. M., Zhand, J., Lenotovich, A., Fel, K., Yan, L. und Sarras, M. P. Jr.** (2002). Epithelial morphogenesis in *Hydra* requires de novo expression of extracellular matrix components and matrix metalloproteinases. *Development.* **129**, 1521-1532.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. und Fire, A.** (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell.* **107**, 465-476.
- Smith, K. M., Gee, L. und Bode, H. R.** (2000). HyAlx, an aristaless-related gene, is involved in tentacle formation in *Hydra*. *Development.* **127**, 4743-4752.
- Spring, J., Beck, K. und Chiquet-Ehrismann, R.** (1989). Two contrary functions of tenascin: dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments. *Cell.* **59**, 325-334.
- Steele, R. E., Lieu, P., Mai, N. H., Shenk, M. A. und Sarras Jr, M. P.** (1996). Response to insulin and the expression pattern of a gene encoding an insulin receptor homologue suggest a role for an insulin-like molecule in regulating growth and patterning in *Hydra*. *Dev. Genes Evol.* **206**, 247-259.
- Steele, R. E.** (2002). Developmental signalling in *Hydra*: What does it take to build a "simple" animal? *Dev. Biol.* **248**, 199-219.
- Stenflo, J., Stenberg, Y. und Muranvi, A.** (2000). Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**, 51-63.
- Stephenson, M. L. und Zamecnik, P. C.** (1978). Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 285-288.
- Straub, K.** (1996). Optimierung einer nicht radioaktiven Methode der *in situ* Hybridisierung von RNA-Sonden bei *Hydra*. Universität Heidelberg.
- Sturtevant, F. M., Sturtevant, R. P. und Turner, R. C.** (1951). Effect of colchicine on regeneration in *Pelmatohydra oligactis*. *Science.* **114**, 241-242.
- Sudhop, S., Coulier, F., Bieller, A., Vogt, A., Hotz, T. und Hassel, M.** (2004). Signalling by the FGFR-like tyrosine kinase, Kringelchen, is essential for bud detachment in *Hydra vulgaris*. *Development.* **131**, 4001-4011.
- Sugiyama, T. und Fujisawa, T.** (1977a). Genetic analysis of developmental mechanisms in *Hydra*. I. Sexual reproduction of *Hydra magnipapillata* and isolation of mutants. *Develop. Growth Differ.* **19**, 187-200.

- Sugiyama, T. und Fujisawa, T.** (1977b). Genetic analysis of developmental mechanisms in *Hydra*. III. Characterization of a regeneration deficient strain. *J. Embryol. Exp. Morph.* **42**, 65-77.
- Suzuki, S., Li, A. j., Ikemoto, M. und Imamura, T.** (2002). Expression of tenascin-C long isoforms is induced in the hypothalamus by FGF-1. *Neuroreport*. **13**, 1041-1045.
- Swindle, C. S., Tran, K. T., Johnson, T. D., Banerjee, P., Mayes, A. M., Griffith, L. und Wells, A.** (2001). Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *J. Cell. Biol.* **154**, 459-468.
- Takahashi, T., Muneoka, Y., Lohmann, J., Lopez de Haro, M. S., Solleder, G., Bosch, T. C. G., David, C. N., Bode, H. R., Koizumi, O., Shimizu, H., Hatta, M., Fujisawa, T. und Sugiyama, T.** (1997). Systematic isolation of peptide signal molecules regulating development in *Hydra*: LWamide and PW families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 1241-1246.
- Tateno, H., Ogawa, T., Muramoto, K., und Kamiya, H.** (2001). A novel Rhamnose-binding lectin family from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) with different structures and tissue distribution. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1328-1338.
- Tateno, H., Ogawa, T., Muramoto, K., Kamiya, H. und Saneyoshi, M.** (2002a). Rhamnose-binding lectins from steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs recognize bacterial lipopolysaccharides and lipoteichoic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 604-612.
- Tateno, H., Ogawa, T., Muramoto, K., Kamiya, H. und Saneyoshi, M.** (2002b). Distribution and molecular evolution of rhamnose-binding lectins in Salmonidae: isolation and characterization of two lectins from white-spotted Charr (*Salvelinus leucomaenis*) eggs. *Biosci Biotechnol Biochem.* **66**, 1356-1365.
- Tateno, H., Saneyoshi, A., Ogawa, T., Muramoto, K., Kamiya, H. und Saneyoshi, M.** (1998). Isolation and characterization of rhamnose-binding lectins from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologous to low density lipoprotein receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* **273**, 19190-19197.
- Tateno, H., Yamaguchi, T., Ogawa, T., Muramoto, K., Watanabe, T., Kamiya, H. und Saneyoshi, M.** (2002c). Immunohistochemical localization of rhamnose-binding lectins in the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp Immunol.* **26**, 543-550.
- Taylor, J. M., Mitchell, W. M. und Cohen S.** (1972). Epidermal Growth Factor. Physical and chemical Properties. *J. Biol. Chem.* **247**, 5928-5934.
- Technau, U., Cramer von Laue, C., Rentzsch, F., Luft, S., Hobmayer, B., Bode, H. R. und Holstein, T. W.** (2000). Parameters of self-organization in *Hydra* aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 12127-12131.
- Technau, U. und Bode, H. R.** (1999). HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in *Hydra*. *Development*. **126**, 999-1010.
- Teragawa, C.K. und Bode, H.R.** (1995). Migration interstitial cells differentiate into neurons in *Hydra*. *Dev. Biol.* **171**, 286-293.
- Thomsen, S., Till, A., Wittlieb, J., Beetz, C., Khalturin, K. und Bosch, T. C. G.** (2004). Control of foot differentiation in *Hydra*: *in vivo* evidence that the NK-2 homeobox factor CnNk-2 autoregulates its own expression and uses pedibin as target gene. *Mech. Dev.* **121**, 195-204.

- Timmons, L. und Fire, A.** (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*. **395**, 854.
- Timmons, L., Court, D. L. und Fire, A.** (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNA can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. **263**, 103-112.
- Tongiorgi, E., Bernhardt, R. R., Zinn, K. und Schachner, M.** (1995) Tenascin-C mRNA is expressed in cranial neural crest cells, in some placodal derivatives, and in discrete domains of the embryonic zebrafish brain *J. Neurobiol.* **28**, 391-407.
- Tripp, K.** (1928). Die Regenerationsfähigkeit von *Hydren* in den verschiedenen Körperregionen. Nach Regenerations- und Transplantationsversuchen. *Z. wiss. Zool.* **132**, 476-525.
- Trembley, A.** (1743). Observation and experiments upon the freshwater polypus. *Philosophic Trans.* **42**, 121-123.
- Tucker, R. P. und Chiquet-Ehrismann, R.** (2006). Teneurins: a conserved family of transmembrane proteins involved in intercellular signaling during development. *Dev. Biol.* **290**, 237-245.
- Tucker, R. P., Chiquet-Ehrismann, R., Chevron, M. P., Martin, D., Hall, R. J. und Rubin, B. P.** (2001). Teneurin-2 is expressed in tissues that regulate limb and somite pattern formation and is induced in vitro and in situ by FGF8. *Dev. Dyn.* **220**, 27-39.
- Turing, A. M.** (1952). The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London.* **237**, 37-72.
- Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. und Sharp, P. A.** (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* **13**, 3191-3197.
- Twell, D., Park, S. K., Hawkins, T. J., Schubert, D., Schmidt, R., Smertenko, A. und Hussey, P. J.** (2002). MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Nat. Cell. Biol.* **4**, 711-714.
- van Mierlo, C. P., Darby, N. J., Neuhaus, D. und Creighton, T. E.** (1991). (14-38, 30-51) double-disulphide intermediate in folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor: a two-dimensional 1H nuclear magnetic resonance study. *J. Mol. Biol.* **222**, 353-371.
- Vaistij, F. E., Jones, L. und Baulcombe, D. C.** (2002). Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell.* **14**, 857-867.
- Wagner, R. W.** (1994). Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature*. **372**, 333-335.
- Wang, P. J. und Huffaker, T. C.** (1997). Stu2p: A microtubule-binding protein that is an essential component of the yeast spindle pole body. *J. Cell Biol.* **139**, 1271-1280.
- Wang, X. Z., Kuroda, M., Sok, J., Batchvarova, N., Kimmel, R., Chung, P., Zinszer, H. und Ron, D.** (1998). Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *EMBO.* **17**, 3619-3630.
- Wainright, P. O., Hinkel, G., Sogin, M. L. und Stickel, S. K.** (1993). Monophyletic origins of the metazoa: An evolutionary link with fungi. *Science*. **20**, 340-342.

- Weber, P., Montag, D., Schachner, M. und Bernhardt, R. R.** (1998). Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family. *J. Neurobiol.* **35**, 1-16.
- Webster, G.** (1967). Studies on pattern regulation in *Hydra*: IV. The effect of cholcemide und puromycin on polarity and regulation. *J. Embryol. Exp. Morph.* **18**, 181-197.
- Webster, G. und Hamilton, S.** (1972). Budding in *Hydra*: the role of cell multiplication and cell movement in bud initiation. *J. Embryol. exp. Morph.* **27**, 301-316.
- Webster, G. und Wolpert, L.** (1966). Studies on pattern regulation in hydra. I. Regional differences in time required for hypostome determination. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **16**, 91-104.
- Weller, A., Beck, S. und Ekblom, P.** (1991). Amino acid sequence of mouse tenascin and differential expression of two tenascin isoforms during embryogenesis. *J. Cell Biol.* **112**, 355-362.
- Whittington, A. T., Vugrek, O., Wei, K. J., Hasenbein, N. G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M. C. und Wasteney, G. O.** (2001). MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature.* **411**, 610-613.
- Wilby, O. K. und Webster, G.** (1970). Experimental studies on axial polarity in *Hydra*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **24**, 595-613.
- Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., Coulson, A., Craxton, M., Dear, S., Du, Z., Durbin, R., Favello, A., Fraser, A., Fulton, L., Gardner, A., Green, P., Hawkins, T., Hillier, L., Jier, M., Johnston, L., Jones, M., Kershaw, J., Kirsten, J., Laisster, N., Latreille, P., Lightning, J., Lloyd, C., Mortimore, B., O'Callaghan, M., Parsons, J., Percy, C., Rifken, L., Roopra, A., Saunders, D., Shownkeen, R., Sims, M., Smaldon, N., Smith, A., Smith, M., Sonnhammer, E., Staden, R., Sulston, J., Thierry-Mieg, J., Thomas, K., Vaudin, M., Vaughan, K., Waterston, R., Watson, A., Weinstock, L., Wilkinson-Sproat, J. und Wohldman, P.** (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature.* **368**, 32-38.
- Wittlieb, J., Khalturin, K., Lohmann, J. U.; Anton-Erxleben, F. und Bosch, T. C.** (2006) Transgenic *Hydra* allow in vivo tracking of individual stem cells during morphogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **103**, 6208.
- Wolpert, L.** (1971). Positional information and pattern formation. *Curr. Top. Dev. Biol.* **6**, 183-224.
- Wolpert, L.** (2002). Principles of development. 2 Auflage. New York: Oxford University Press.
- Wolpert, L., Clarke, M. R. B. und Hornbruch, A.** (1972). Positional signalling along *Hydra*. *Nat. New Biol.* **239**, 103-105.
- Wolpert, L., Hornbruch, A. und Clarke, M. R. B.** (1974). Positional information and positional signalling in *Hydra*. *Am. Zool.* **14**, 647-663.
- Yabe, D., Nakamura, T., Kanazawa, N., Tashiro, K. und Honjo, T.** (1997). Calumenin, a Ca(2+)-binding protein retained in the endoplasmic reticulum with a novel carboxyl-terminal sequence, HDEF. *J. Biol. Chem.* **272**, 18232-18239.

- Yan, W. L., Lerner, T. J., Haines, J. L. und Gusella, J. F.** (1994). Sequence analysis and mapping of a novel human mitochondrial ATP synthase subunit 9 cDNA (ATP5G3). *Genomics*. **24**, 375-377.
- Yan, L. Pollock, G. H., Nagase, H. und Sarras, M. P. Jr.** (1995). A 25.7×10^3 M(r) hydra metalloproteinase (HMP1), a member of the astacin family, localizes to the extracellular matrix of *Hydra vulgaris* in a head-specific manner and has a developmental function. *Dev. Biol.* **219**, 115-128.
- Yan, L., Fei, K., Zhang, J., Dexter, S. und Sarras M. P. Jr.** (2000). Identification and characterization of *Hydra* metalloproteinase 2 (HMP2): a meprin-like astacin metalloproteinase that functions in foot morphogenesis. *Development*. **127**, 907-920.
- Yao, T.** (1945). Studies on the organizer problem in *Pelmatohydra oligactis*. I. The induction potency of the implants and the nature of the induced hydranth. *J. Exp. Biol.* **21**, 147-150.
- Yasuhara, H., Muraoka, M., Shogaki, H., Mori, H. und Sonobe, S.** (2002). TMBP200, a microtubule bundling polypeptide isolated from telophase tobacco BY-2 cells is a MOR1 homologue. *Plant Cell Physiol.* **43**, 595-603.
- Zamore, P. D. , Tuschl, T. Sharp, P. A. und Bartel, D. P.** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.
- Zanuttin, F., Guarnaccia, C., Pinta, A. und Pongor, S.** (2004). Folding of epidermal growth factor-like repeats from human tenascin studied through a sequence frame-shift approach. *Eur. J. Biochem.* **271**, 4229-4240.
- Zhang, H., Kolb, F. A., Brondani, V., Billy, E. und Filipowicz, W.** (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNA at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J.* **21**, 5875-5885.
- Zihler, J.** (1972). Zur Gametogenese und Befruchtungsbiologie von *Hydra*. *Wilhelm Roux' Arch. Dev. Biol.* **169**, 239-267.

6 Abkürzungen

Abu	α -amino-Buttersäure
Acc.-Nr	Accession-Nummer
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
CDK	Cyclin dependent kinase
cDNA	Complementary DNA
CRD	Carbohydrate recognition domain
Cys	Cystein
DEPC	Diethyl-cyanphosphonat
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal growth factor
EGF-R	Epidermal growth factor receptor
EST	Expressed sequence tags
FA	Fußaktivator
FGF	Fibroblast growth factor
FGF-R	Fibroblast growth factor receptor
FI	Fußinhibitor
FITC-Dextran	Fluoresceinisothiocyanat-markiertes Dextran
FNIII	Fibronectin Typ III
FRAM-1	Fußaktivator reagierende Matrix Metalloproteinase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSK3 β	Glycogen-Synthase-Kinase 3 β
kb	Kilobase
LEP	Lokale Elektroporationsprozedur
LiCl	Lithiumchlorid
LPS	Lipopolysaccharide
LTP	Lipoteichonsäure
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MTOC	Mikrotubuli Organisationszentrum
PKC	Proteinkinase C
P-Wert	Positionswert
RACE PCR	rapid amplification of cDNA ends durch polymerase chain reaction
RBL	Rhamnose-bindende Lektine

RDRP	RNA dependent RNA Polymerase
RISC	RNA induced silencing complex
RNAi	RNA Interferenz
RTK	Rezeptor Tyrosinkinase
siRNA	Short interference RNA
TA Domänen	Tenascin assembly domain
TEN	Teneurin
TM Domäne	Transmembrandomäne
TN	Tenascin

7 Anhang

7.1 cDNA Sequenzen des Expressionsscreenings

Dargestellten sind die Sequenzen der cDNAs die zur Charakterisierung aus einem Expressionsscreening einer LiCl induzierten cDNA-Bank ausgewählt wurden. Sequenzen die mit einem T3-Primer sequenziert wurden geben den Sinnstrang des Transkriptes wieder.

MEK27 mit T3-Primer

```
1 CCTCAACATAAAAAACATTTTAGAATTTGTAAGTACTGTTTCAGACATAACAAGCGAAGAAAATCACAATG 70
71 AAGTAAAAATGCGGAATCATCGTTTATAAAACATCGATCTGTGGAACAGGATGAGTTATTGGCAAAATGCAG 140
141 TTAAAAATTTCCCGTGTTTGTACGATAATAAACATGTCGACTATAAAAAACAGTGAAGCAAGACAAAATGC 210
211 TTGGAATTACGTCGCTGGATTAATAAACTTGCATGCGGAGATGATGCTTGCCGACTTTTCGAAACATTA 280
281 AAAAAGCGATATAGTAGAAAGAAAGTTAATTTCAAAAAAGCACACCACCAATCGCATTTCAGAAAATGTTA 350
351 TCAAGAAAACCTCAAGAAGATTTTTTATCCTA 381
```

MK11 mit T3-Primer

```
1 CACATACTGAAACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGTTTAAAAATAAGAATATGAAGAGATTTTGAAGAGT 70
71 GTATATTTTCTTTAAAGAGATCAGTTTGACAATATTGGGATTTGTTTATGATGGCAACACTTGTGATCA 140
141 ATATGGTTGTTCTTCTCTTGATATAAGTTTTTTTACTTATAAAACAGAAAGAGGCAACAAAAACAATGC 210
211 TACTAACACATCAGCTATAATAATCCAGACATTAGCAACACATTTGTTAGCTTTCACATTGCTTCTGAC 280
281 GTTGTGTGTCATAGATATTCTAATGAATTTTAGACCGCTATCGAGCAGTCCAGAAAAAGTGACTTTCA 350
351 ACTCATGGA 359
```

MK12 mit T3-Primer

```
1 GAAATATTGTCATGCCTAAGTCTCGAAGAAATAAAGTTATTTCTCTAAGTAAACAACAAAGAAAGAATT 70
71 TCAAACTAAAAAAGTCTTGTGGATGAGATTTCGTAAGTGCTGTGATGAGTATACATCTCTTTATGTATT 140
141 TTCCGTTGAAAACATGAGGAACGATAAGCTCAAAGACGTTTCGACAAAAGTGGAAAACGAGTCGTTTTTTT 210
211 TATGGAAAAAACAAGTAATGGCTTTTGGTTTAGGGGAGAACTAAAGAAATTGAATATAAAGAAAATTTAC 280
281 ACAAATATCATCGGAGCTCGTAGGTAATGTTGGAATCATGTTTACAAACGAGTCACAACAAGTTGTGAA 350
351 AGAATGGTTTGAAAAATTTTCA 373
```

MK13 mit T3-Primer

```
1 AGCGGATTTCAAGATGAAGATCGCCATTATTATTGCATCTCTTGCACTTTTGTGTTGCACCTTTTCTGCA 70
71 CCTGTTCAACAGGATGATTGCGAGATTTTTTTTAGTAAAGAGTTGTGTTCAAGTTACAAAAGCATAGAAG 140
141 ACGATGAATCAATAAGCAATGATAGTCTCGAAGCAAATGATGTTGACGAGGCCACTCAAGAATTTTAAAG 210
211 AAACGCTTTGAAAGCTAAATTGGATTTCCTTATTAACCTTGGATTGTTACAAAAAATTCATTATTGGG 280
281 CAAGTCATTCACGATTTTGTGCGGCTGATCCTCAAGGAGTTGCTGATGCTTTAAAGGGTGGAATTTT 348
```

MK16 mit T3-Primer

```
1 TACAGATCCGGCCTTTTGGCTAGGTCAAGAAGAACTCGTGTCTAGTCTTAGCCCTCGTGGCTCAATATC 70
71 GATGAAGAAAAATAAGAAGATGACGAAAAAATACCACATTTTCCGAAGAAATATGCTTATTTTCTAAAT 140
141 CTGATAACATTAATCCAAGTGAAGTAGTTTCATTGGATTGTGAAATGGTCGGCATTTCAAACAACCAAGA 210
211 TGCCTTAGGACGTTGCGATATCGTAGATTATTTTGAAATGTTTATATNGACAAAATATGTAAAGCCGGA 280
281 AAGTACTATTACTGATTATAGAATAAGTGGAGTGGAATAAAACCTCATCCATGCACCAAGCAATATCTT 350
351 TTAA 354
```


MK19 mit T3-Primer

```
1 CTTTTCCTCAAGAGGATAGCCAAGATGACGCGAGGTCCAAAGAAGCACCTCAAGCGGCTAAATGCTCCTAAG 70
71 CATTGGATGTTGGACAAGTTGAGTGGAACTTTGCTCCTCGTCCTTCACCTGGTCCACATAAAATTGAGAG 140
141 AATGCTTGCCATTAATTGTGTCTTGAGAAACAGATTAAAGTATGCATTTAACTACGCTGAAGTTACTAAA 210
211 ATTATGAAACAGCGCCTCATAAAGGTTGATGGAAAAGTTAGGACTGATATATGTTATCCACAGGATTATG 280
281 GATGTGGTTCAATTGAAAGGACCATGAAATTTCCGCTGTGGATGATGTCA 330
```

MK21 mit T3-Primer

```
1 ACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGATAGTAAATGGGTGAAAAGCCTCAAAGCAGTTGTGAAAAAAGACGA 70
70 CAGATTTCTGTGGCAGAATTCCAACCTTTAGAAACAGTAAAGCATATAAAACAAGCATTTAATCGTCATA 140
141 TTCATTACACTGTTCT 156
```

MK23 mit T3-Primer

```
1 GTTGAAGGGTGTAGGTTGTGTCTTATCTTTAGCTTAAGCAACTAAATAATGTTTTCTGTTCAAAAACG 70
70 TTTTACCAGTTTTAAGAAATGTGGCTCGTGTAGCATTAAACCACAAAGTAGTATACTTGCAAGGACTCC 140
141 AATGCTTCCATCACAGGCTTAGTTTCCTCTGACTCAATCTATTCATACTACATCTGCTGTCC 202
```

MK23 mit T7-Primer

```
1 GNTNTTTTTTGGTTTTCTCTTGGGGCCNACCGTTTTTCCCTNGNTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATAA 70
70 CTTTTAAACACTTCTACTGTACATACTACAATTTTTTTAGATTTTAGGGTTTTTGGTGCCTACAGCC 140
141 CAAAAAGTATTAATAATGACATCATAAGGGAGAAAAGTCCCATAGCTTCAGATAAAGCAAATCCCAAAT 210
211 AGCATAAGAAAACAGTTGAGGTTTTAAAGATGGATTTTCGTGCATAACCGATAATCAAGCTTCCAAATACT 280
281 GTTCCGATACCAGCTCCAGATCCTGCACATCCTACGGTTGCAGCACCAGCTCCAATAAACTTAGCAGCTT 350
351 GTTCTATATCACGGACAGCAGATGTAGTATGAATGAGATTGAGTCAGAGGAATAAAGCCTGTGATGGAAG 420
421 CTTTGGAGTCTTGAAGGATACTCCTTGGGGGTT 455
```

MK25 mit T3-Primer

```
1 TGAAACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGACATTAAATATCAATCTTCGCTAAAAAAAAAAAAATAATAATT 70
71 TAACGTCAGTAATTATTGAGTGCTTTGGCTCATTAATGGTCGATAATGATTTTTTAAATGTAGTGAAG 140
141 TTGTAAAGAAGAACCAGAAATAATCCGAGTCAATGATTATTTAAATGTTGGATACATCAGCTGCAGTGAC 210
211 ATTTTTAATAGTTCTTGCCGTGGCGGCAATTTTTTAAATTCCTATGTATATACATTATCAGAGCAACA 280
281 AAAGTTTAAAAACAGACCCGCTCTAGTATGCCTATTCTTAACCTGGTAATGATACATTTATTTCAA 346
```

MK28 mit T3-Primer

```
1 GAATTTCTGTCTATATCGAGATCAGGAGCAATAGTGACAAATGTCTAACAAAGTAAAGCCTCACATCAACA 70
71 TCGTTGTCTATCGGACATGTCGACTCAGGAAAATCAACAAGTACTGGCCACATGATTTACAAATGTGGTGG 140
141 TATCGACAAACGACAAATCGAAAAATTCGAGAAAGAAGCCAGGAAATGGGAAAAGGATCATTTAAATAT 210
211 GCCTGGGTTTTAGATAAACTTAAGGCTGAACGTGAAAGAGGTATCACCATCGATATTGCACTATGGAAGT 280
281 TTGAAACTACTAAATACGTAGTTCTATTATTGATGCTCCTGGACTCGTGA 330
```

MK30 mit T3-Primer

```
1 AAAACACATACTGAAACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGTTAAATGGAAAGTTACAAGGGTCTAAACCA 70
71 GAGCATATTAAATAAATATATGGAACCTTGATACAAAAGGTAAATTCAGCAAACCTACATATGGATTGA 140
141 TGGTTTCAGGTAAACATTCGATCAAAAACAAAACCTTGATTATGAACCTGAAACACCTGATCAGCTC 210
211 CCAATTTGGAACCTTTGATGGTTCGTCAACAGGTCAAGCAACCGGACTAATAGCGATGTTTATTTGCACC 280
281 CAGTGGCTATTTTTTCCGACCTTTTAGAGAAGGTAAGCATAAGCTTGTCTCTGCGAAACTTATCTTATG 350
```

MK31 mit T3-Primer

```
1 GACTTCTGGCTTTCCGGTGCAGTAGAGTAAACGGTTGAGCTTGCGGTATTTCTTTATTAAATATGGCTA 70
70 CTAATGCAGAACATAAAACCAAATCTATAACTGTCACATAAAAGACTGTCAAAGTTGTAAGTAAACGAGA 140
141 TAAGGATGAGTATCCACGTGCTGAAATGAAAGATGGAAAATACTTACTGCCTTGGCAAACAGAGAAGTA 210
211 CCACCTGATGGCTGGACCAACTTCAAATCATTTTTTTCACCTGATAGCAGTGGAGTACCAGGAGAAGAAA 280
281 AATTGAATGAAGAGCCCTTAATGCAGCTAATGAAGGCTGCCACAGCGTATTGAAAATCCCCAGAAN 347
```

MK33 mit T3-Primer

```

1 GAGNGNNNNNGAGGNNNGNNNAGNNTNTNTTTTTTGTCTCTAAACTGGGGGGCGNGCTNNTTTCGGNGGCG 70
70 GCCGCTCTANACTAGTGGATCCCCCGNCTGCAGGAATTCGGCACGAGTGTTATTACACATTTTCTGAA 140
141 AAGAAAAATTTATAATAATATTATAAGAAAAATGTGTTTGATTCTGATGTTGACATTAATATTAACAGTG 210
211 ACTGCAAAATATGATTACAGTTTAAAGCAAGATATTTGAACGATGTTAAATTCAACTGAAGATTTTG 280
281 AAGACTTAGAAAATGATCAGCAATCACAAGATGCAAAATTTCAAGAAGCACATATTGGGTAAAATCTATT 350
351 CTTTTGAAAACCTTCTACCATTCAAACATATCGAATTGGAATTTTGGCAGATGGTTCANCACTGCATCTTTG 420
421 TTGGCAAATGGCTGGAATGTTCGGGATTGTTANAGC 457

```

MK35 mit T3-Primer

```

1 GGAGNNNAGNNTNNNTTTGGTTTCCTAAAGCTGGNCTCCCCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGACTAGTGGAT 70
71 CCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGTGTACGGCCATATTGTAAGTAAAATATTAGATACCTTTTA 140
141 TTTTTATTTGGAAAAAATGCAATTTCCAGATGCTATGATGCATGAAAACATATGGTTTGACCGTCTCTAAA 210
211 TACGAGGAAGAANNANAGCACTATGAGCTATTCTTGACAAATAACTTATCTTCTAAACTANCTGAAACTC 280
281 ACTGNAAGAGAG 294

```

MK36 mit T3-Primer

```

1 GAGTGTTCNGGANGAAGNNNAAGNNTNTNTTTTTTGGTNANNTTAGTANNAAAAANGCTTTTNTTCGGGGG 70
71 CGGCCGCTCTAGNAACTAGTAGGATCCCCCGNCTCTAGCAGGAATTCGGCACGAGCAAAGATTCAGGTAA 140
141 TGCAAAAAAAGATTGTTTCGAGAATTTTCAAAAGATCCAGAAGAANAATCANANGCTGANANACC 210
211 TGANNANNNCAAAANNNNNNACNANGNNNANNTTTTTTTTTTTTTTN 248

```

MK37 mit T7-Primer

```

1 TTTTTTTTTTTTTTTTTTCCACGCGTCGCAATGCTTCCTGCATTTTTTCTATTTTCATCGCTCATTGATAAC 70
70 TCTTCGTCCGTTAAAAAACCCTGTTGAAAAACTTCTCTGTTATCGTTAATGTCTTGATATTTTGAAGATT 140
141 TTTGTGTTGTTTCGTCTAGGAAGTGAAGACGTGTACGGATTAAGTACATTTTCACTGTTTTTTTTTAGGTGG 210
211 AGGTACCGGAGCTTTTTTTTTTAAACTTCTAGTACTTGCCACAGAAGATGTATGACTGCTGCTACTTTTCG 280
281 TATCCGTCAGAATCGCCATGTAAGTGCATCAGAGTGCTCGTTGGCACGATTGCGTTCGGTTCGCGAATC 350
351 GATCTGTAGATAT 363

```

MK40 mit T3-Primer

```

1 AAAAAGCTTAGAAGAGAAGTTGAGAAAGCTAAGCGAACTCTAAGTACTCAACATCAAAGTAACTAGACTTGAAAT 70
70 TGAATCATTATTTGATGGAGAGGATTTTTTCAAGAACTAACACGAGCAAAATTTGAAGAGTTGAAGTTG 140
141 GATTTATTCAAATCTACAATGAAACCTGTTAAGCAAGTAATTGATGATTCTGGTCTTAAATTAAGTGAGA 210
211 TTGATGAAATAGTTTTTGGTTGGAGGATCTACTCGTATTCTTAAAGTTCAAAAGTTAGTACAAGATTTCTT 280
281 CCAAGGCAAGAACCAGCAAGGAATTAACCTGATGAAGCAGTTGCATTTGGTGCTGCAGTCCAAGGC 350

```

MK45 mit T3-Primer

```

1 GATACAACAATCACTTTTGAGTTTATTCGTTTTTACACAAAGTTTATTTTCTATTAATGCTTTAGAATTT 70
71 AAAAAGTGCATGATAAAACCGACTCCAGCAGTTCTTTTTTGCATTTAAATACGCTGACTGGAACAACACAG 140
141 TTATTGATTTTCAACAGTACAAAGGAAACGTTCTTTTAGTGGTAAATGTTGCCACTTTTTGAGGTTTAAAC 210
211 AACACCAAACCTTCTTGAATTAAATGCATTATTAATAAATATTCAGAAGTAATGGATGTTTCGCTCAAT 280
281 GTCATTGCATTTCTTCAAATCAGTTTAACCAAGCGCCAGGAACAGTGACGAGTTCCGGAACCTCTG 350

```

MK51 mit T3-Primer

```

1 GTAGTACCTGTGGTACCTAACCTAAATTTAAGTGACCTTCTTAAAAATGGCTCAACCACCTACCATTCA 70
70 TAAAGGCATTGTAAAGTCGGTTCTATCAGGTGATAGGTGTCATAATTCGTGGTCAACCAAAAGGTGGACC 140
141 TCCTCCTGAAAGACAGCTTGCTCTTTCTAATGTNTTGACCACGTTTATCAAAACGTCCTCCGGGAGGAAT 210
211 GTTGAAACAGCAGCTGATGGAGCCATATGCCTGGGGAAAGTCGTGAATTTCTTAAGGAAGAACTATTG 280
281 GAAAAGAGATTGAATTTTTTATTTGGATNATAAAGNACCTGGATCCGAAGAAGATATGGTTGTATATTTN 350
351 GAATCAANCTCTGG 364

```

MK52 mit T3-Primer

```
1 GAAGTTTGAACTACTAAATACGTAGTTACTATTATTGATGCTCCTGGACATCGTGACTTCATTAAAAAT 70
70 ATGATCACAGGTACCTCTCAGGCTGATTGTGCCGTACTCATCGTTGCAAGCAGTACTGGAGAGTTTGAAG 140
141 CTGGTATTTCCAAAAATGGTCAAACCAGAGAACATGCTCTTTTGGCTTTTACTCTAGGTGTTAAACAAAT 210
211 GATTGTTGCTGTTAATAAAATTGACAACACTGAACCACCATACAGCGAAGCTCGATTTAACGAAATCAAA 280
281 AAAGAAATTAGTGCTTACGTTAAAAAAGTTGGTTATGATCCTAAGACTGTTCCAGTGCTTCCAGTCTCAG 350
351 GATGGCACGGAGATN 365
```

MK54 mit T3-Primer

```
1 GAAACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGATTAATAAAATTAGATATTTTTAAAGCACAGATAATCTCTAAG 70
70 GGAGATAGAAAATACCATCTCAGAAGTAAAGTTGTTGATCAACGAATCAAACGATTNTTCAAAAATTATT 140
141 GGATCAATTAGTTAAGTCATGCAATTCCCTTGATCCTNTAAGCTTGTTGCAGGAGACAAGTCATTCTTTT 210
211 TACAAGAAGTAGTCGAGTTTAGCTCCAGTAAGGGAATTAATAGAGCACATACGAAGATGGGGACTTGTAT 280
281 AGCTAAATACCCAACGTGAGAAAGAATGCACCCNTTTGTTACGATCAAATACCAGAAGAAGTCGATTGGTA 350
351 CTCCCGN 357
```

MK57 mit T3-Primer

```
1 CTCTAAACCTACGTAAGTCCTCGTCGTCCTTTTGAAAAGGCGCGTTTAGATCAGGAATTAAGTTAATT 70
70 GGAGAATATGGTCTCAGAAATAAACGAGAAGTTTGGCGTGTTAAGTATTGCTTAGCTAAAATTAGGAAAA 140
141 GAGCCAGAGATTTGCTAACCCCTTCCAGAAAAAGATGCACGTCGACTGTTTGAAGGAAATGCTTTACTTCG 210
211 ACGCCTTGTTTCGTATTGGAGTACTTGATGAAGGAAGAATGAAGCTAGATTATGTTTTAGGTTTAAAAGTA 280
281 GAAGATTTTTTGGAAAGACGTCTACAAACTCAAGTGTTTAAAGTTGGGTCTCGCTAAGTCTATTCACCATG 350
351 CTCGTGTTCTTATCCGCAAAGCATT 375
```

MK57 mit T3-Primer

```
1 CTCTAAACCTACGTAAGTCCTCGTCGTCCTTTTGAAAAGGCGCGTTTAGATCAGGAATTAAGTTAATT 70
70 GGAGAATATGGTCTCAGAAATAAACGAGAAGTTTGGCGTGTTAAGTATTGCTTAGCTAAAATTAGGAAAA 140
141 GAGCCAGAGATTTGCTAACCCCTTCCAGAAAAAGATGCACGTCGACTGTTTGAAGGAAATGCTTTACTTCG 210
211 ACGCCTTGTTTCGTATTGGAGTACTTGATGAAGGAAGAATGAAGCTAGATTATGTTTTAGGTTTAAAAGTA 280
281 GAAGATTTTTTGGAAAGACGTCTACAAACTCAAGTGTTTAAAGTTGGGTCTCGCTAAGTCTATTCACCATG 350
351 CTCGTGTTCTTATCCGCAAAGCAT 375
```

MK58 mit T3-Primer

```
1 GATACTCAGCTCTTCTCTTTTTTAAACAAACACTTAATCAAAATGGCCGATGATGAAGTTGCCGCCCTCG 70
70 TTGTTGATAATGGATCTGGTATGTGTAAAGCTGGATTTGCTGGTGATGATGCTCCAAGAGCTGTTTTCCC 140
141 ATCTATTGTTGGACGTCTCGTCATCAAGGAGTCATGTTGGTATGGGACAGAAGGATTCTATGTCGGT 210
211 GACGAAGCTCAGAGCAAACGTGGTATCTTAACTTTGAAATACCCAATTGAACACGGAATTGTAACAACT 280
281 GGGATGATATGGAAAAAATTGGGCATCACACTTTTTTACAATGAGCTCCGTGTGCTCCAGAAGAACACCC 350
351 TGTCTTCTTACTGAAGCTCCCT 373
```

MK62 mit T3-Primer

```
1 TCAAAACAACGATCTTTGGATACGAAACTGGATTATATTTATCAAAATCCAGCTTATTTTACAAATTATAG 70
70 CTGAAGAGTGATTCTATTTCAAATAATGGGTCAAAATCAATCTGGAACAGGTGGATCAAATCAAATA 140
141 AAAAAGACGATAAAGGATAAAAAAGAAAAAATACGAACCTCCAATTCCCTACTAGAGTTGGTAAAAAAGCTAA 210
211 GAAAAAAAATAGAGGCCAGATACTGCAAACAAATTACCTCAAGTCACTCCTCATAGAAATTGCAGATTA 280
281 AAACACTGAAATTAGAACGTATCAAAGATTTCTTTTAAATGGGAGGAAGAATTTATTCAAATCAGGAA 350
351 AGATTAAAGCCACAGGAAGAAAACATGAG 379
```

MK66 mit T3-Primer

```
1 TTAAAGTGTCTTTTCGAAGCTCGTGAAATTGCTCTACATTAAAAATGGTTGAAGGTGGTGAAATTGAAAC 70
70 TTTTCGCTTTTCAAGCAGAGATTGCTCAGCTAATGAGCTTAATTATTAACACGTTTACTCTAATAAAGAA 140
141 ATTTATTTGCGAGAATTGATTCTAATGCTTCAGATGCGTTAGACAAAAATTCGTTATTTATCATTAACCTG 210
211 ATCTACTGTTTGGATTCTGGAAGCGAATTAAAGATAGACATTATCCCAAACAAAGATGAGAAAACCAT 280
281 CACCATTTTTTGACACCGGTATTGGTATGACTAAAGCAGATCTTGTCAACAATCTTGGCACAATTGCTAAA 350
351 TCAGGAACAAAAGCGTTTATGGA 373
```

MK68 mit T3-Primer

```

1  TTNNTTTTTTTTGTAGNGNCCGCTNNNTTTCGGTGGCGCCCGCTCTAGACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGG  70
70  AATTCGGCACGAGAAAAAAGAGTTTGTCTGGATGGTGTGTTCAAAGCAGAACTGAACGAATTTTTTG  140
141  AAACGGGAACCTTGCTGAGGATGGTTACAGTGGGGTTGAAGTTCGTGTTACTCCTTTGAGAACAGAAATAA  210
211  TTATTCTCGCCACAAGACTCAAAATGTTTTGGGAGAAAAAGGTAGACGTATAAGAGAGCTTACTTCAGTA  280
281  GTTCAGAAGAGATTTAACTTTCCTGAAGGAAGCGTGGAGTTATATGCAGAGAAAGTTGCTCACGTGGCCT  350
351  GTGTGCAATTGCTCAATGTGAATCGCTTAAATATAAACTTCTAGCTGGTGCACCCGTGAGAAAAGCTTGG  420
421  TATNGGNGTTGGTCGATTTATCTNGGAGAGN  451

```

MK68 mit T7-Primer

```

1  TTTTTTTTTTTTCTGCTGCAATATATTTTTATTATGTCGAGATGTTTACAAATATCTAGCATTATCGATAT  70
70  ATCAATATTTCTTGATGGTCAGCCTTAACTAAAACGTTACATAACAGGTTGCAATGGAACAAGATCAATTT  140
141  TGCCACCTTTTGTTCAGATGTTGGAGGATAGAAAACCTCTTCTTTTGGTTCAACAATTGATACATGATC  210
211  TGGCAATGGCTTTTGGGGCAGTTTGTCTGTTGGATCCCATGG  253

```

MK71 mit T3-Primer

```

1  GAGAATATAGGACGTGATGATAAAAAATCAAGAAAAAAGAGCAGTGGCAATCTGGAAGATACAAATAA  70
70  AGAACCAACTTCAAAAAACGGCGGAACAAATCCAAAAGTTTACTTTGATATAAGTATTAATGATCAGTA  140
141  CACTGGTAGAATACTGATGGAGTTGCGATCAGATGTTGTTCCGTAACTGTAGAAAAATTTTCGTGTTTG  210
211  TGCACTCATGAAAAAGGTTTTGGGTTTCGTAAGTCTTTTCACAGAATTATTCCTGGATTTATGTGTCA  280
281  AGGAGGTGACTTTCTAAAAATGATGGAACAGGAGGAAAATCAATATTTGGAAGAAATTTGAAGATGAAA  350
351  ATTTTGTCT  359

```

MK74 mit T3-Primer

```

1  TCAGATCTAATAATTTTCTTCGCTTCTCTGAAAATTATTCGTCAAAAGACCCGAAGGCAGTTCACCATTT  70
70  GTGGAACCTTGCCACCGCCAATTTTAATCATTTGGGCGCACGATTCTTGGGATATAAAATACAAAGCGT  140
141  ACAGCTAGCATTTGCTAAGTGATATAAAGATGAACAGTGTCAATGAACTGAGTACAGTTTACATAAGA  210
211  CTCTGTTATCAATGTTTGTAAATGATGATTTCAATATGAGAGATTTACTGCGATTAAAAACTAACTCAAGT  280
281  GGAAGAGAAATATAAAGATGACCCCTTTCTATATATGCAACCTTGATGATGTTGTAAGAAAGTATTGGAAAT  350
351  TCCAAGAACATTTACCCAAGTCC  373

```

MK85 mit T3-Primer

```

1  ATGCTCATTACAAAGATATGATTGCTCGTGATGAACGAAGATTCAAACCTAGCTGATACAAATAATGATGG  70
70  CAGGCTTAGTCGAGAACAGTTTGCTTCGTTTTTGCATCCAGAGAGTGATGATAACATGAAACCGTTAGTT  140
141  GTTCAAGAACTCTAGAAGATATTGATAAAAAATAAGATGGAAGCATTTCTCTTGATGAGTACATAGGTG  210
211  ATTTATGGCCAGAGGAAGACAGAGTTGCTGGTAACGAGCCTGAATGGGTGAAGAGTGAACGAGAGCAGTT  280
281  CACTAATTATCGTGATATTAATAAAGATGGCAAAATGGATAAAGAAGAAGTNCAGCATGGATACTGGCTT  350
351  CTGN  354

```

MK85 mit T7-Primer

```

1  TTTTTTTTTTTAAAAAATAAAATTAAAAAATCTTTCTAAAAATATTATTTTCAATTACATTTTCATCATGCTT  70
70  GTATTTCAAAGCTTCGCCGAAATCCGTTGCCTGGCTACCAACAAATAAATCATATTTTCTACAACTTCA  140
141  CTCTTTGTTAATTTTCCATCATCATCAGTATCAGCTTCCGTAATCAAATGTTGAGCTTCTGAGGTAATAT  210
211  GGTCGTAATCAGGAGGCAGTATCCATGCTGCTACTTCTTCTTTATCCATTTTGCCATCTTTATTAATATC  280
281  ATCACGATAATTAGTGAACCTGCTCTCGTTCACTCTTACCCATTTCAGGCTCGTTACCAGC  340

```

MK99 mit T3-Primer

```

1  GTCGATTTTCTCAAAATATAAAAAAGATTTCTTCCTGTGTTTTCAACTTCTTCTAGGAAACTTCTTTTGAA  70
70  TAGATATTACTTATTTACGAGAGAAATGAGCATCACTGTTAACGTGGATGTTAAAAACTACCCAAGTGT  140
141  TCGCTGCTTACTGTTGCACACCTTCAAGAAAAATGGTATTAAAGTAACGCTTCGAGAGGGAAACAGTACGT  210
211  TTGTAAACTGAGC  224

```

MK99 mit T7-Primer

```
1  TTTTTTTTCTCCTTGAGCAGTTACAGAGTCAAACAAAGCTTGAGATGTTTGTTCTTTCAACTGATTCTCT 70
70 TTGTTAACGAGAGTTTTTTGCTCTTTTGGCTCTTGTTTTACTTGCTTTTTACTGGAAGAAGATTTTCCC 140
141 TTGATGAAGATGAGCTAGCATTTGCTTTGTCTTTACCTTGATTCATCATCCCAGAAGAACTCCATCAGG 210
211 TATATGAAACAGTTTGCAAGGAGTTTCAAGACCTGAGTGACGACTTGACAGATTGGTAGGGGTCATCACA 280
281 ATAAAAAACCCACGTCTTTGAAGTTGAATAATGT
```

7.2 Alignments der RBL EST-Sequenzen

In den folgenden Kapiteln sind die Alignments der EST-Sequenzen, die eine Sequenzähnlichkeit von über 90% mit den Sequenzen *MK55* und *MK97* besitzen dargestellt. Des Weiteren ist das Alignment der vier EST-Sequenzen aus *H.echinata*, aus dem die Konsensussequenz eines Rhamnose-bindenden Lektins erstellt wurde, abgebildet.

7.2.1 Alignment mit *MK55* und EST-Sequenzen

MK55	199	GACTGTGGCGGAGTTGCCCTGGTGC	328	GAATGTTTCTCTCAAAAGTC	328
CA302255	1	GACTGTGGCGGAGTTGCCCTGGTGC	130	GAATGTTTCTCTCAAAAGTC	130
CD566988		-----		-----	
CD267291		-----		-----	
CA301986		-----		-----	
MK55	329	GTGTTTGGTGATCCATGCGTAGGA	458	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	458
CA302255	131	GTGTTTGGTGATCCATGCGTAGGA	260	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	260
CD566988		-----		-----	
CD267291		-----		-----	
CA301986		-----		-----	
MK55	459	TTGAAATAGTTGATGCAAAATATG	588	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	588
CA302255	261	TTGAAATAGTTGATGCAAAATATG	390	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	390
CD566988		-----		-----	
CD267291		-----		-----	
CA301986		-----		-----	
MK55	589	TTTCGTGTACCGTTAAAGGCTCC	718	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	718
CA302255	391	TTTCGTGTACCGTTAAAGGCTCC	520	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	520
CD566988	1	-----	64	-----	64
CD267291	1	-----	21	-----	21
CA301986		-----		-----	
MK55	719	AAAAATGATTGTAATGGTAAAG	848	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	848
CA302255	521	AAAAATGATTGTAATGGTAAAG	625	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	625
CD566988	65	AAAAATGATTGTAATGGTAAAG	184	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	184
CD267291	22	AAAAATGATTGTAATGGTAAAG	151	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	151
CA301986	1	-----	82	-----	82
MK55	849	TTTATACAAAACAGCTGTTTCA	978	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	978
CA302255	625	TTTATACAAAACAGCTGTTTCA	625	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	625
CD566988	185	TTTATACAAAACAGCTGTTTCA	313	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	313
CD267291	152	TTTATACAAAACAGCTGTTTCA	280	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	280
CA301986	83	TTTATACAAAACAGCTGTTTCA	212	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	212
MK55	979	TGTACGAGCATGTGAAGGTAGT	1108	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	1108
CA302255	625	TGTACGAGCATGTGAAGGTAGT	625	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	625
CD566988	314	TGTACGAGCATGTGAAGGTAGT	443	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	443
CD267291	281	TGTACGAGCATGTGAAGGTAGT	410	AGTACCTATTGCAAGGACGCGATCT	410

Abb. 42: Nukleotidalignment von *MK55* mit ähnlichen EST-Sequenzen aus *Hydra magnipapillata*. Die Sequenzunterschiede zu *MK55* sind grau unterlegt.

MK55	1109	TGTAACAATGAAAAAATAACAATTGAACCTGGTTAATAAAAACTGTTTCAGCAAAA	TCTTCTTGTA	CTATTAAAGCCTCAAAATGCAGTATTGGCGACCCCATG	TGTGTGGAA	CATATAAATATCTTGAAGTGC	1238
CA302255	625	-----	-----	-----	-----	-----	625
CD566988	444	TGTAACAATGAAAAAATAACAATTGAACCTGGTTAATAAAAACTGTTTCAGCAAAA	TCTTCTTGTA	CTATTAAAGCCTCAAAATGCAGTATTGGCGACCCCATG	TGTGTGGAA	CATATAAATATCTTGAAGTGC	573
CD267291	411	TGTAACAATGAAAAAATAACAATTGAACCTGGTTAATAAAAACTGTTTCAGCAAAA	TCTTCTTGTA	CTATTAAAGCCTCAAAATGCAGTATTGGCGACCCCATG	TGTGTGGAA	CATATAAATATCTTGAAGTGC	540
CA301986	343	TGTAACAATGAAAAAATAACAATTGAACCTGGTTAATAAAAACTGTTTCAGCAAAA	TCTTCTTGTA	CTATTAAAGCCTCAAAATGCAGTATTGGCGACCCCATG	TGTGTGGAA	CATATAAATATCTTGAAGTGC	472
MK55	1239	AATACAGTTGCAACTAATAAAACGTTTTTTTATTGTTTCACATACTCATAAATGTA	TACTTCAA	ATTGAAATTTAAA	TGTAATTGAGTTAAATGATGGTATTAGTTTTTTTAAAA	TATTTAAATAAATGGA	1368
CA302255	625	-----	-----	-----	-----	-----	625
CD566988	574	AATACAGTTGCAACTAATAAAACGTTTTTTTATTGTTTCACATACTCA	TACTCA	-----	-----	-----	629
CD267291	541	AATACAGTTGCAACTAATAAAACGTTTTTTTATTGTTTCACATACTCATAA	T-----	-----	-----	-----	591
CA301986	473	AATACAGTTGCAACTAATAAAACGTTTTTTTATTGTTTCACATACTCATAA	TGTAATG	TATTTAAA	TGTAATTGAGTTAAATGATGGTATTAGTTTTTTTAAAA	TATTTAAATAAATGGA	602
MK55	1321	AAAAAAAAAAAA	1379				
CA302255	625	-----	625				
CD566988	629	-----	629				
CD267291	591	-----	591				
CA301986	603	AAAA-----	606				

7.2.2 Alignment mit *MK97* und EST-Sequenzen

CF658427	1	-----AAGGGCTCAAGTCGTGCTTTTTCATTTGCTTTTGTGCGAGTTGCTCATGCCCAAGTCTTTACGCACTTCGCGAGCATGTGAAGGGTATGGGCTGAAAAATTGATTGCACC	115
CF601388	1	-----CTTTTTCGCAATTTGTCCTTTTGTGCGAGTTGCTCATGCCCAAGTCTTTACGCACTTCGCGAGCATGTGAAGGGTATGGGCTGAAAAATTGATTGCACC	98
CV985431	1	-----CTAAAGTCGTGCTTTTTCGCAATTTGTCCTTTTGTGCGAGTTGCTCATGCCCAAGTCTTTACGCACTTCGCGAGCATGTGAAGGGTATGGGCTGAAAAATTGATTGCACC	110
CV985984	1	TTAAACATGGCTAAAGTCGTGCTTTTTCGCAATTTGTCCTTTTGTGCGAGTTGCTCATGCCCAAGTCTTTACGCACTTCGCGAGCATGTGAAGGGTATGGGCTGAAAAATTGATTGCACC	120
CF593934	1	TTAAACATGGTTAAAGTCGTGCTTTTTCGCAATTTGTCCTTTTGTGCGAGTTGCTCATGCCCAAGTCTTTACGCACTTCGCGAGCATGTGAAGGGTATGGGCTGAAAAATTGATTGCACC	120
CV464140	1	TTAAACATGGCTAAAGTCGTGCTTTTTCGCAATTTGTCCTTTTGTGCGAGTTGCTCATGCCCAAGTCTTTACGCACTTCGCGAGCATGTGAAGGGTATGGGCTGAAAAATTGATTGCACC	120
CV660179	1	TTAAACATGGCTAAAGTCGTGCTTTTTCGCAATTTGTCCTTTTGTGCGAGTTGCTCATGCCCAAGTCTTTACGCACTTCGCGAGCATGTGAAGGGTATGGGCTGAAAAATTGATTGCACC	120
CF593703	1	-----GAGCATGTGAAGGGTATGGGCTGAAAAATTGATTGCACC	38
CV223232	1	-----TCATGCCCAAGTCTTTACGCACTTCGCGAGCATGTGAAGGGTATGGGCTGAAAAATTGATTGCACC	64
MK97		-----	
CF778867		-----	
CN623089		-----	
CV465772		-----	
CN777636		-----	
CF778575		-----	
CN550982		-----	
CN569267		-----	
CD285895		-----	
CB890945		-----	
CB888376		-----	
CF658893		-----	
CF656230		-----	
CN771549		-----	
CN622659		-----	
CF656720		-----	
CN628156		-----	
CD681714		-----	
CD268324		-----	
CB888380		-----	
CD266880		-----	
CB888374		-----	

Abb. 43: Nukleotidalignment von *MK97* mit ähnlichen EST-Sequenzen aus *Hydra magnipapillata*. Die Sequenzunterschiede zu *MK97* sind grau unterlegt, die Sequenz von *MK97* ist fett hervorgehoben.

CF658427	116	GGTCAGGGAGTAATTGAAGTAGTCAGTGCAGTAATTATGGTAGAACGTTGTCCTAATGTTTCTCTCTGGAGCACAATCTTCAAACCGTAATAATGTAATAATCAAGCAAAATCATTAGAAGTTGCT	235
CF601388	99	GGTCAGGGAGTAATTGAAGTAGTCAGTGCAGTAATTATGGTAGAACGTTGTCCTAATGTTTCTCTCTGGAGCACAATCTTCAAACCGTAATAATGTAATAATCAAGCAAAATCATTAGAAGTTGCT	218
CV985431	111	GGTCAGGGAGTAATTGAAGTAGTCAGTGCAGTAATTATGGTAGAACGTTGTCCTAATGTTTCTCTCTGGAGCACAATCTTCAAACCGTAATAATGTAATAATCAAGCAAAATCATTAGAAGTTGCT	230
CV985984	121	GGTCAGGGAGTAATTGAAGTAGTCAGTGCAGTAATTATGGTAGAACGTTGTCCTAATGTTTCTCTCTGGAGCACAATCTTCAAACCGTAATAATGTAATAATCAAGCAAAATCATTAGAAGTTGCT	240
CR593934	121	GGTCAGGGAGTAATTGAAGTAGTCAGTGCAGTAATTATGGTAGAACGTTGTCCTAATGTTTCTCTCTGGAGCACAATCTTCAAACCGTAATAATGTAATAATCAAGCAAAATCATTAGAAGTTGCT	240
CV464140	121	GGTCAGGGAGTAATTGAAGTAGTCAGTGCAGTAATTATGGTAGAACGTTGTCCTAATGTTTCTCTCTGGAGCACAATCTTCAAACCGTAATAATGTAATAATCAAGCAAAATCATTAGAAGTTGCT	240
CV660179	121	GGTCAGGGAGTAATTGAAGTAGTCAGTGCAGTAATTATGGTAGAACGTTGTCCTAATGTTTCTCTCTGGAGCACAATCTTCAAACCGTAATAATGTAATAATCAAGCAAAATCATTAGAAGTTGCT	240
CR593703	1	-----AATCTTCAAACCGTAATAATGTAATAATCAAGCAAAATCATTAGAAGTTGCT	50
CV223232	39	GGTCAGGGAGTAATTGAAGTAGTCAGTGCAGTAATTATGGTAGAACGTTGTCCTAATGTTTCTCTCTGGAGCACAATCTTCAAACCGTAATAATGTAATAATCAAGCAAAATCATTAGAAGTTGCT	158
MR97	65	GGTCAGGGAGTAATTGAAGTAGTCAGTGCAGTAATTATGGTAGAACGTTGTCCTAATGTTTCTCTCTGGAGCACAATCTTCAAACCGTAATAATGTAATAATCAAGCAAAATCATTAGAAGTTGCT	184
CF778867		-----	
CN623089		-----	
CV465772		-----	
CN777636		-----	
CF778575		-----	
CN550982		-----	
CN569267		-----	
CD285895		-----	
CB890945		-----	
CB888376		-----	
CF658893		-----	
CF656230		-----	
CN771549		-----	
CN622659		-----	
CF656720		-----	
CN628156		-----	
CD681714		-----	
CD268324		-----	
CB888380		-----	
CD266880		-----	
CB888374		-----	

CF658427	236	CGTAAAGAGTTGCTCAGGCA	GATCC	TCGTGCTCTTA	TTCAAAGCAACCAATGCAGTT	TTTGGCGATCCATGTTGGAAACATACAAGTATCTTGAAGTACAAATATCGATGTAAAGTACCAGTG	355
CF601388	219	CGTAAAGAGTTGCTCAGGCA	GATCC	TCGTGCTCTTA	TTCAAAGCAACCAATGCAGTT	TTTGGCGATCCATGTTGGAAACATACAAGTATCTTGAAGTACAAATATCGATGTAAAGTACCAGTG	338
CV985431	231	CGTAAAGAGTTGCTCAGGCA	GATCC	TCGTGCTCTTA	TTCAAAGCAACCAATGCAGTT	TTTGGCGATCCATGTTGGAAACATACAAGTATCTTGAAGTACAAATATCGATGTAAAGTACCAGTG	350
CV985984	241	CGTAAAGAGTTGCTCAGGCA	GATCC	TCGTGCTCTTA	TTCAAAGCAACCAATGCAGTT	TTTGGCGATCCATGTTGGAAACATACAAGTATCTTGAAGTACAAATATCGATGTAAAGTACCAGTG	360
CR593934	241	CGTAAAGAGTTGCTCAGGCA	GATCC	TCGTGCTCTTA	TTCAAAGCAACCAATGCAGTT	TTTGGCGATCCATGTTGGAAACATACAAGTATCTTGAAGTACAAATATCGATGTAAAGTACCAGTG	360
CV464140	241	CGTAAACAGTTGCTCAGGCA	GATCC	TCGTGCTCTTA	TTCAAAGCAACCAATGCAGTT	TTTGGCGATCCATGTTGGAAACATACAAGTATCTTGAAGTACAAATATCGATGTAAAGTACCAGTG	360
CV660179	241	CGTAAACAGTTGCTCAGGCA	GATCC	TCGTGCTCTTA	TTCAAAGCAACCAATGCAGTT	TTTGGCGATCCATGTTGGAAACATACAAGTATCTTGAAGTACAAATATCGATGTAAAGTACCAGTG	360
CR593703	51	CGTAAAGAGTTGCTCAGGCA	GATCC	TCGTGCTCTTA	TTCAAAGCAACCAATGCAGTT	TTTGGCGATCCATGTTGGAAACATACAAGTATCTTGAAGTACAAATATCGATGTAAAGTACCAGTG	170
CV223232	159	CGTAAACAGTTGCTCAGGCA	GATCC	TCGTGCTCTTA	TTCAAAGCAACCAATGCAGTT	TTTGGCGATCCATGTTGGAAACATACAAGTATCTTGAAGTACAAATATCGATGTAAAGTACCAGTG	278
MR97	185	CGTAAACAGTTGCTCAGGCA	AAATCC	TCGTGCTCTTA	TTCAAAGCAACCAATGCAGTT	TTTGGCGATCCATGTTGGAAACATACAAGTATCTTGAAGTACAAATATCGATGTAAAGTACCAGTG	304
CF778867		-----					
CN623089		-----					
CV465772		-----					
CN777636		-----					
CF778575		-----					
CN550982		-----					
CN569267		-----					
CD285895		-----					
CB890945		-----					
CB888376		-----					
CF658893		-----					
CF656230		-----					
CN771549		-----					
CN622659		-----					
CF656720		-----					
CN628156		-----					
CD681714		-----					
CD268324		-----					
CB888380		-----					
CD266880		-----					
CB888374		-----					

CF658427 356 CATGTTGCACGAGCTTGGCAAGGTTTTAATCTCAAATAATTGTTTCGATAGTCATGAAGTAATTTGAAGTGCTTAATGCCAAACTATGGCAGAACAATTATCTAATAATTTGTCCTGGAGCACAA 475

CF601388 339 CATGTTGCACGAGCTTGGCAAGGTTTTAATCTCAAATAATTGTTTCGATAGTCATGAAGTAATTTGAAGTGCTTAATGCCAAACTATGGCAGAACAATTATCTAATAATTTGTCCTGGAGCACAA 458

CV985431 351 CATGTTGCACGAGCTTGGCAAGGTTTTAATCTCAAATAATTGTTTCGATAGTCATGAAGTAATTTGAAGTGCTTAATGCCAAACTATGGCAGAACAATTATCTAATAATTTGTCCTGGAGCACAA 470

CV985984 361 CATGTTGCACGAGCTTGGCAAGGTTTTAATCTCAAATAATTGTTTCGATAGTCATGAAGTAATTTGAAGTGCTTAATGCCAAACTATGGCAGAACAATTATCTAATAATTTGTCCTGGAGCACAA 480

CV593934 361 CATGTTGCACGAGCTTGGCAAGGTTTTGAATCTCAAATAATTGTTTCGATAGTCATGAAGTAATTTGAAGTGCTTAATGCCAAACTATGGCAGAACAATTATCTAATAATTTGTCCTGGAGCACAA 480

CV464140 361 CATGTTGCACGAGCTTGGCAAGGTTTTAATCTCAAATAATTGTTTCGATAGTCATGAAGTAATTTGAAGTGCTTAATGCCAAACTATGGCAGAACAATTATCTAATAATTTGTCCTGGAGCACAA 480

CV660179 361 CATGTTGCACGAGCTTGGCAAGGTTTTAATCTCAAATAATTGTTTCGATAGTCATGAAGTAATTTGAAGTGCTTAATGCCAAACTATGGCAGAACAATTATCTAATAATTTGTCCTGGAGCACAA 480

CV593703 171 CATGTTGCACGAGCTTGGCAAGGTTTTGAATCTCAAATAATTGTTTCGATAGTCATGAAGTAATTTGAAGTGCTTAATGCCAAACTATGGCAGAACAATTATCTAATAATTTGTCCTGGAGCACAA 290

CV223232 279 CATGTTGCACGAGCTTGGCAAGGTTTTAATCTCAAATAATTGTTTCGATAGTCATGAAGTAATTTGAAGTGCTTAATGCCAAACTATGGCAGAACAATTATCTAATAATTTGTCCTGGAGCACAA 398

MK97 303 CATGTTGCACGAGCTTGGCAAGGTTTTAATCTCAAATAATTGTTTCGATAGTCATGAAGTAATTTGAAGTGCTTAATGCCAAACTATGGCAGAACAATTATCTAATAATTTGTCCTGGAGCACAA 424

CF77867
CN623089
CV465772
CN777636
CF778575
CN550982
CN569267
CD285895
CB890945
CB888376
CF658893
CF656230
CN771549
CN622659
CF656720
CN628156
CD681714
CD268324
CB888380
CD266880
CB888374

CF 658427 476 TCTTCAAACGTAATAATGCAAGAATCAAGCAAAATCATTAGTAGTTGTTCTGTAACAGCTTGTCTCAGGTAAATCTTCGTGTGTCATCCAAAGCATCCAATGC-TGTTTTTGGCGATCCCAT-
CF 601388 459 TCTTCAAACGTAATAATGCAAGAATCAAGCAAAATCATTAGTAGTTGTTCTGTAACAGCTTGTCTCAGGTAAATCTTCGTGTGTCATCCAAAGCATCCAATGC-TGTT-
CV 985431 471 TCTTCAAACGTAATAATGCAAGAATCAAGCAAAATCATTAGTAGTTGTTCTGTAACAGCTTGTCTCAGGTAAATCTTCGTGTGTCATCCAAAGCATCCAATGC-TGTTTTTGGCGATCCCATGTGT
CV 985984 481 TCTTCAAACGTAATAATGCAAGAATCAAGCAAAATCATTAGTAGTT-
CV 593934 481 TCTTCAAACGTAATAATGCAAGAATCAAGCAAAATCATTAGTAGTTGTTCTGTAACAGCTTGTCTCAGGTAAATCTTCGTGTGTCATCCAAAGCATCCAATGC-TGTTTTT-
CV 464140 481 TCTTCAAACGTAATAATGCAAGAATCAAGCAAAATCATTAGTAGTTGTTCTGTAACAGCTTGTCTCAGGTAAATCTTCGTGTGTCATCCAAAGCATCCAATGC-TGTTTTTGGCGATCCCATGTGT
CV 660179 481 TCTTCAAACGTAATAATGCAAGAATCAAGCAAAATCATTAGTAGTTGTTCTGTAACAGCTTGTCTCAGGTAAATCTTCGTGTGTCATCCAAAGCATCCAATGC-TGTTTTTGGCGATCCCATGTGT
CV 593703 291 TCTTCAAACGTAATAATGCAAGAATCAAGCAAAATCATTAGTAGTTGTTCTGTAACAGCTTGTCTCAGGTAAATCTTCGTGTGTCATCCAAAGCATCCAATGC-TGTTTTTGGCGATCCCATGTGT
CV 223232 399 TCTTCAAACGTAATAATGCAAGAATCAAGCAAAATCATTAGTAGTTGTTCTGTAACAGCTTGTCTCAGGTAAATCTTCGTGTGTCATCCAAAGCATCCAATGC-TGTTTTTGGCGATCCCATGTGT
MK 97 425 TCTTCAAACGTAATAATGCAAGAATCAAGCAAAATCATTAGTAGTTGTTCTGTAACAGCTTGTCTCAGGTAAATCTTCGTGTGTCATCCAAAGCATCCAATGC-TGTTTTTGGCGATCCCATGTGT
CF 777867
CN623089
CV 465772
CN777636
CF 7778575
CN550982
CN569267
CD285895
CB890945
CB888376
CF 658893
CF 656230
CN771549
1
CN622659
1
CF 656720 1
CN628156
1
CD681714
CD268324
CB888380
CD266880
CB888374

CF658427	590	-----	590
CF601388	460	-----	460
CV985431	590	CGGAACATACCAATATCTTGAAGTACCAATATCAATGT-----	626
CV985984	527	-----	527
CK593934	584	-----	584
CV464140	600	CGGAACATACAAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTGCAACG-----	698
CV660179	601	CGGAACATACAAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTGCAACG-----	719
CK593703	600	AGGAACATACAAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTGCAACG-----	618
CV223232	518	CGGAACATACAAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTGCAACG-----	611
MK97	544	CGGAACATACAAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTGCAACG-----	662
CF778867		-----	
CN623089		-----	
CV465772	1	-----GTTTTGAAATATATCTTTG-----	43
CN777636		-----	
CF778575		-----	
CN550982	1	-----TAAATCACCTGTGCAATGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	83
CN569267	1	-----TTGGTTTGAATAATCTTTG-----	45
CD285895	1	-----AAATATCTTGAAGTATCTTTG-----	71
CB890945	1	-----GCAATGTGAGGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	58
CB888376	1	-----GGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	49
CF658893	1	-----TATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	106
CF656230	41	-----ACAGATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	159
CN771549	1	-----AAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	111
CN622659	2	-----AAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	120
CF656720	8	-----AAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	126
CN628156	1	-----AAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	109
CD681714	3	-----CATACAAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	121
CD268324	1	-----CATACAAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	114
CB888380	1	-----CATACAAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	114
CD266880	1	-----CATACAAATATCTTGAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	119
CB888374	1	-----GAAGTACAATATCAATGTAAATCACCTGTGGGTTCGCGGAGCATGTGAAAGTTCTGGTTTGAATAATCTTTG-----	100

CF658427	590	-----	-----
CF601388	460	-----	-----
CV985431	626	-----	-----
CV985984	527	-----	-----
CK593934	584	-----	-----
CV464140	698	-----	-----
CV660179	720	TCAATGCAAACTATG	-----
CK593703	619	TCAATGCAAACTATGGAGAACTATGCTAATAATTTGTC	CC-----
CV23232	611	-----	-----
MK97	663	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	782
CF778867	1	-----	-----
CN623089	1	-----	-----
CV465772	44	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAATACCAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	163
CN777636	1	-----	-----
CF778575	1	-----	-----
CN550982	84	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	203
CN59267	46	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	165
CD285895	72	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	191
CB890945	59	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	178
CB888376	50	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	169
CF658893	107	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	226
CF656230	160	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	279
CN771549	112	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	231
CN622659	121	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	240
CF656720	127	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	246
CN628156	110	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	229
CD681714	122	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	241
CD268324	115	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	234
CB888380	115	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	234
CD266880	120	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	239
CB888374	101	TCAATGCAAACTATGGTAGAACAATTTGCTAATAATTTGCTCTGGAGCACAATCTTCAAACACCAAAATGTAATAATCAAGTAAAAATCATTAGCAGTTGTTTCGCAACAGTTGCTCAGGTAGAT	220

CF658427	590	-----	-----	590
CF601388	460	-----	-----	460
CV985431	626	-----	-----	626
CV985984	527	-----	-----	527
CK593934	584	-----	-----	584
CV464140	698	-----	-----	698
CV660179	734	-----	-----	734
CK593703	659	-----	-----	659
CV23232	611	-----	-----	611
MK97	783	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	902
CF778867	95	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	214
CN623089	83	CTTTGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	202
CV465772	164	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	283
CN777636	22	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	141
CF778575	97	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	216
CN550982	204	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	323
CN59267	166	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	285
CD285895	192	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	311
CB890945	179	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	298
CB888376	170	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	289
CF658893	227	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	346
CF658230	280	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	399
CN771549	232	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	351
CN622659	241	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	360
CF656720	247	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	366
CN628156	230	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	349
CD681714	242	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	361
CD268324	235	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	354
CB888380	235	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	354
CD266880	240	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	359
CB888374	221	CTTCGTGTGGCATCCAAAGCAACCAATGCAGTTTTTGGCGATCCTTGTGTGGGAACATACAAATACTTTGAAGTGCATAATCAATGTGTATCCACAAGTGAATGTTGTACGAGCTTGC	GAAG	340

CF658427	590	-----	-----
CF601388	460	-----	-----
CV985431	626	-----	-----
CV985984	527	-----	-----
CK593934	584	-----	-----
CV464140	698	-----	-----
CV660179	734	-----	-----
CK593703	659	-----	-----
CV23232	611	-----	-----
MK97	903	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	1022
CF778867	215	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	334
CN623089	203	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	322
CV465772	284	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	403
CN777636	142	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	261
CF778575	217	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	336
CN550982	324	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	443
CN569267	286	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	405
CD285895	312	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	431
CB890945	299	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	418
CB888376	290	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	409
CF658893	347	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	466
CF656230	400	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	519
CN771549	352	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	467
CN622659	361	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	480
CF656720	367	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	486
CN628156	350	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	469
CD681714	362	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	481
CD268324	355	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	474
CB888380	355	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	474
CD266880	360	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	479
CB888374	341	GAAGCAATCTAAAGATTAAATTGCAACGGCAATGGAACAATTAAAGTGTTCGAACGGCAATATGGTCGAAAGTTATCTAAATGTTGGCCCTGGAGCACAAATCAACAAACATTAATTTGCAATA	460

CF658427	590	-----	-----	590
CF601388	460	-----	-----	460
CV985431	626	-----	-----	626
CV985984	527	-----	-----	527
CK593934	584	-----	-----	584
CV461140	698	-----	-----	698
CV660179	734	-----	-----	734
CK593703	659	-----	-----	659
CV223232	611	-----	-----	611
MK97	1023	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CF778867	335	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CN623089	323	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CV465772	404	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CN777636	262	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CF778575	337	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CN550982	444	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CN559267	406	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CD285895	432	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CB890945	419	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CB888376	410	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CF658893	467	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CF656230	520	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CN771549	467	-----	-----	-----
CN622659	482	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CF656720	487	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CN628156	470	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CD681714	482	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CD268324	475	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CB888380	475	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CD266880	480	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG
CB888374	461	ATCAAGGAAATCACTTGCAGTAACTCAA	TTACAAATGTTTGGCAAACCTTCTTTGTACTGTCGCGGCAACTAATGCAGT	TTTTTGGCGATCCCTGTGTTGGAACTACAATAACCTTTGAAG

CF658427	590	-----
CF601388	460	-----
CV985431	626	-----
CV985984	527	-----
CK593934	584	-----
CV464140	698	-----
CV660179	734	-----
CK593703	659	-----
CV223232	611	-----
MK97	1142	-----
CF778867	455	-----
CK623008	443	-----
CV465772	524	-----
CV777636	382	-----
CF778575	457	-----
CK550382	564	-----
CV569267	526	-----
CD285895	552	-----
CB890945	539	-----
CB888376	530	-----
CF658893	587	-----
CF656230	640	-----
CN771549	467	-----
CN622659	590	-----
CF656720	607	-----
CN628156	585	-----
CD681714	602	-----
CD268324	595	-----
CB888380	595	-----
CD266880	600	-----
CB888374	581	-----

7.2.3 Alignment der EST-Sequenzen aus *H. echinata*

C0540567	1	-----AAGATTTTCAGCTTCGTTGATCGCGTGTATTTGATGTTTACGTTTGTCAGGCATTA	96
C0372116	1	CAAGTTACTTGAGAAACCAAGATGAAGATTTTCAGCTTCGTTGATCGCGTGTATTTGATGTTT	120
C0536150		-----	
C0372356		-----	
C0540567	97	CAAGGAGCAGCTATTATAATAACAATCTGCAAAAGTTCGCAAACTTCGCAAACTTCGCAAA	216
C0372116	121	CAAGGAGCAGCTATTATAATAACAATCTGCAAAAGTTCGCAAACTTCGCAAACTTCGCAAA	240
C0536150		-----	
C0372356		-----	
C0540567	217	AAAGCGATTTGTGATGGCAACGATCGTGCAAAATTCCTGCAAAATGAAATGTTGATGATC	335
C0372116	241	AAAGCGATTTGTGATGGCAACGATCGTGCAAAATTCCTGCAAAATGAAATGTTGATGATC	359
C0536150	1	-----ATGGTGTGTTTATAAAGTATTTGAAAGTCACTTTCAATGTCAGAGGTACCTGG	51
C0372356		-----	
C0540567	336	ACCACAGGAAGTTGCTTGCAGAGAGAGTCGATTAAAGTTGAAATGTCTCTGCAAAATTTAT	455
C0372116	360	ACCACAGGAAGTTGCTTGCAGAGAGAGTCGATTAAAGTTGAAATGTCTCTGCAAAATTTAT	479
C0536150	52	ACCACAGGAAGTTGCTTGCAGAGAGAGTCGATTAAAGTTGAAATGTCTCTGCAAAATTTAT	171
C0372356		-----	
C0540567	456	TGTCCTACTATCCTTATAAAGTGCTGTGTTGGCAGCATCGTCTTTTGCTGAACTCAGCGG	552
C0372116	480	TGTCCTACTATCCTTATAAAGTGCTGTGTTGGCAGCATCGTCTTTTGCTGAACTCAGCGG	555
C0536150	172	TGTCCTACTATCCTTATAAAGTGCTGTGTTGGCAGCATCGTCTTTTGCTGAACTCAGCGG	291
C0372356	1	-----AACAAAGTTTTCGGGGATCC	20
C0540567	552	-----	
C0372116	555	-----	
C0536150	292	TTTGCCCCTGGCGTCTACAAATATTTGGCTGTGCGGTATACCTGTTATACCACTCGTTCC	411
C0372356	21	TTTGCCCCTGGCGTCTACAAATATTTGGCTGTGCGGTATACCTGTTATACCACTCGTTCC	140
C0540567	552	-----	
C0372116	555	-----	
C0536150	412	GATTACATCTGCTAATTACGGCAGAGGTTTCGAAATATATTTGCTCTGTTTCAAAATTC	531
C0372356	141	GATTACATCTGCTAATTACGGCAGAGGTTTCGAAATATATTTGCTCTGTTTCAAAATTC	260
C0540567	552	-----	
C0372116	555	-----	
C0536150	532	AAAACCTTCTGTTCCATCTCTGCTTCAAAATGAAATGTTTGTAGTACCGCTGCAAGGGAG	651
C0372356	261	AAAACCTTCTGTTCCATCTCTGCTTCAAAATGAAATGTTTGTAGTACCGCTGCAAGGGAG	380
C0540567	552	-----	
C0372116	555	-----	
C0536150	652	AACGATCTTATTTCCTTATTTATGATACCTTTAAATATATTTTCAAAACCTGAAAAAAA	717
C0372356	201	AACT	447

Abb. 44: Alignment der vier EST-Sequenzen von *H. echinata* die zur Bildung einer Konsensussequenz dienten. Unterschiede der Sequenzen sind grau unterlegt.

7.3 Sequenzähnlichkeit der HEAT Sequenzwiederholungen von *MK38* und den Proteinen der MAP215/Dis1 Familie

Tabelle 12: Sequenzähnlichkeit der 5 HEAT Sequenzwiederholungen der MAP215/Dis1 Proteine und MK38. Angegeben ist die Sequenzähnlichkeit in Prozent der HEAT Wiederholung mit der der MAP215/Dis1 Proteine der ersten bzw. zweiten B-Typ TOG Domäne.

	HEAT-1	HEAT-2	HEAT-3	HEAT-4	HEAT-5
XMAP215	65,6	45,4	62,5	50,0	43,7
ch-TOG	62,5	51,5	59,3	53,1	43,7
MspS	62,5	60,6	56,2	40,6	46,8
Zyg9	57,5	48,4	43,7	34,3	28,1
DdCP224	36,3	36,3	34,3	34,3	21,8
DIS1	30,3	42,4	37,5	40,6	25,0
Alp14	30,3	39,3	50,0	31,2	50,0
Stu2	39,3	24,2	34,3	21,8	25,0
MOR1	26,4	33,3	31,2	25,0	34,3
TMBP200	29,4	33,3	37,5	31,2	37,5

8 Zusammenfassung

Zellen der Gastralregion gelangen durch den steten Gewebefluss in das basale Ende von *Hydra*. Dabei ändert sich Form und Funktion bis sie schließlich terminal zu fußspezifischen Zellen differenziert sind. Um neue Erkenntnisse über die molekularen Vorgänge der Musterbildungsprozesse die hierbei ablaufen zu erhalten, wurden drei Transkripte (*K10-7*, *MK55* und *MK97*) mit einer Expression in der Fußregion charakterisiert. Analysen des Expressionsmusters und der Aminosäuresequenz ermöglichten Aussagen über die potentielle Funktion dieser Gene.

K10-7 besitzt Sequenzähnlichkeit zu der EGF-ähnlichen Domäne der Mitglieder der Tenascin und Teneurin Familie, zwei Proteinfamilien die durch Zell-Zell Interaktionen bei der Gewebebildung beteiligt sind (Chiquet-Ehrismann, 2004; Tucker und Chiquet-Ehrismann, 2005). Das Protein ist möglicherweise bei der Transdifferenzierung der Epithelzellen zu Zellen der Fußscheibe beteiligt. Expressionsstudien mit Doppelfärbung deuten auf eine Interaktion mit dem FGF-Rezeptor Kringelchen bei der Grenzbildung in Geweben.

Die Transkripte *MK55* und *MK97* sind mit den Rhamnose-bindenden Lektine (RBL) verwandt. Sie sind Teil der großen RBL Familie, deren Sequenzen durch die Analyse einer EST-Datenbank von *Hydra magnipapillata* gefunden wurden. *MK55* und *MK97* könnten in das von fußspezifischen Drüsenzellen gebildete Sekret abgegeben werden und dort durch Agglutination von Bakterien einen Schutz vor Erregern vermitteln.

In einem weiteren Ansatz wurde das Transkript *MK38* charakterisiert. Die Transkription von *MK38* ist in allen entodermalen Zellen mit Ausnahme des Hypostoms nachweisbar. Die unvollständige Sequenz zeigt Ähnlichkeit mit Proteinen der MAP215/Dis1 Familie. Möglicherweise spielt *MK38* bei der Zellteilung eine Rolle.

In einem zweiten Projekt sollte mittels der RNAi Methode, die bereits für *Hydra magnipapillata* erfolgreich etabliert worden war (Lohmann, 1999), die Funktionen der untersuchten Gene charakterisiert werden. Dazu wurden vier verschiedenen Elektroporationsgeräte benutzt, die jeweils unterschiedliche elektrische Impulse erzeugen konnten. Mit den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen war es nicht möglich, ähnliche RNAi Effekte, wie sie bei *H. magnipapillata* beschrieben wurden, auch bei *Hydra vulgaris* zu erzeugen.

9 Danksagung

In erster Linie geht mein Dank an Frau Prof. Dr. Hassel für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit.

Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl sei Dank für ihre Bereitschaft ein Zweitgutachten zu erstellen.

Herrn Prof. Dr. Beck und Dr. Klingenspor danke ich, dass sie sich Zeit nehmen und Teil meiner Prüfungskommission sind.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft danke ich für die Finanzierung des Projektes HA 1732/4.

Markus Klenk und Annette Bieller danke ich für die Überlassung der Transkripte, die ich in dieser Arbeit charakterisiert habe.

Ein großes Dankeschön geht an alle ehemaligen und derzeitigen Mitglieder der Arbeitsgruppe Hassel für die freundliche Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank geht an Stefanie Sudhop für ihre jahrelange Unterstützung und die Bereitschaft zur Diskussion. Sowie an Verena Chankiewicz für ihre Hilfe in „letzter Minute“ und den fleißigen Korrekturlesern Christian Haase, Laurence Lang und Chan Hee Lischke. Heide Brandtner danke ich für ihre Hilfsbereitschaft in unserer Gruppe und den kleinen Leckereien, die der Stimmungsaufheiterung dienten.

Ein ganz liebes Dankeschön geht an meine Lieben: An meine Mutter, die mich auf mannigfaltige Weise unterstützt, an meine Schwester meinem Ratgeber in alle Lebenslagen und an Andrea für Ihre Geduld und Ihr Verständnis.

10 Lebenslauf

Zur Person

	Tobias Hotz
	Emil-von-Behring-Str. 26
	35041 Marburg
geboren	15. Oktober 1970 in Heidelberg
Familienstand	ledig

Schulbildung

1982 – 1991	Heidelberg College Gymnasium
-------------	------------------------------

Zivildienst

1991 – 1992	Zivildienst bei der Arbeiterwohlfahrt in Heidelberg, Abteilung: Mobiler Sozialer Hilfsdienst
-------------	--

Studium

1993 – 1995	Grundstudium im Fach Biologie (Diplom) an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
1995 – 1998	Hauptstudium an der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg
1998 – 1999	Anfertigung der Diplomarbeit im Zoologischen Institut der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg, Abteilung: Molekularen Genetik Thema: Das Translationsinitiationssignal <i>E.coli</i> : Abhängigkeit der Shine-Dalgarno-Region von Fragmentlänge und Sekundärstruktur der mRNA beim Bakteriophagen T7 Gen 0,3; (Note 1,6)

Promotion

1999 - 2006	Promotion am Zoologischen Institut der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg, Abteilung: Molekulare Entwicklungsbiologie und Physiologie und am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg, Abteilung: Spezielle Zoologie Thema: Identifizierung und Charakterisierung von regio-spezifisch exprimierter Gene bei <i>Hydra vulgaris</i> .
-------------	--

Marburg, den 13.07.2006

11 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation **Identifizierung und Charakterisierung regio-spezifisch exprimierter Gene bei *Hydra vulgaris*** unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Hassel (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 13.07.2006

